Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Phytochemische Untersuchungen der Fructus Cardui benedicti

Die Verbreitung des Arctiins bei den Cynareae

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst Schulz
aus
Berlin

1961

Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Phytochemische Untersuchungen der Fructus Cardui benedicti

Die Verbreitung des Arctiins bei den Cynareae

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst Schulz
aus
Berlin

6264/61

Referent: Professor Dr. R. Hänsel
Korreferent: Professor Dr. G. Schenck

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 19.5.1961

Tag der Promotion: 19. Juli 1961

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543918_0012

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. HÄNSEL durchgeführt.

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle meinem verehrten Lehrer Herrn Professor Dr. R. HÄNSEL für seine wertvollen Ratschläge und stete wissenschaftliche Förderung meiner Arbeit herzlichst zu danken.

Ebenfalls möchte ich dem Herrn Prorektor Professor Dr. G. SCHENCK in seiner Eigenschaft als Direktor des Pharmazeutischen Institutes der Freien Universität meinen Dank aussprechen für die freundliche Erlaubnis zur Benutzung der Bibliothek wie auch zum Gebrauch von Geräten und Apparaturen des Pharmazeutischen Institutes.

Mein Dank gilt der Leitung und den Gärtnern des Botanischen Gartens in Berlin-Dahlem für die Beschaffung des umfangreichen Untersuchungsmaterials.

Ferner möchte ich mich bedanken bei Herrn Dr.E. WINDE, Assistent am Institut für Pharmakognosie, der mir durch Hinweise und wertvolle Diskussionen freundliche Unterstützung angedeihen ließ.

Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dipl.-Ing.J.HUBER, Leiter des Analytischen Kontrollaboratoriums der Firma Schering AG Berlin für die Ausführung der Elementaranalysen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	6
Botanik und Chemie der Cnicus benedictus L.	9
A. Hauptteil	
I. Cnicussubstanz C aus Früchten von Cnicus benedictus	11
1. Vergleichende Voruntersuchungen	11
2. Die Isolierung der Cnicussubstanz C	13
a) Einleitende Voruntersuchungen	13
b) Isolierung	16
c) Reinigung an einer Polyamidsäule	16
d) Einige Eigenschaften	17
e) Hydrolysen	18
α) Das Aglykon	18
β) Der Zuckeranteil	18
f) Spezifische Drehung	19
g) Elementaranalyse	19
3. Isolierung von Arctiin aus Fructus Bardanae	20
4. Vergleichschromatographie der Cnicussubstanz C und des Arctiins	21
5. UV-Absorptionsspektren	22
6. Die Konstitution des Arctiins	23
7. Prüfung des Arctiins auf antibakterielle Wirksamkeit	24
II. Isolierung eines Phytosterolins aus Früchten von Cnicus benedictus L.	26
1. Einige Eigenschaften des Sterolinaglykons	27
2. Farbreaktionen	28
3. Chromatographische Untersuchungen	29
4. UV-Absorptionsspektrum	32
III. Isolierung einer kristallinen Substanz aus der Ätherfraktion der Kardobenediktenfrüchte	33
IV. Phytochemisch-systematische Untersuchungen	34
1. Vorbemerkungen	34
2. Chemie der Lignane und Lignine	35
3. Verbreitung der Lignane im Pflanzenreich	36
4. Die Verbreitung des Arctiins bei den Cynareae	39

	Seite
a) Botanische Übersicht	39
b) Untersuchungsmethode	41
c) Ergebnisse	42
d) Diskussion der Ergebnisse	44
V. Zur Flavonoidführung in der Gattung Arctium	47
1. Orientierende Untersuchungen	47
2. Isolierung einer flavonoiden Verbindung aus Blättern von Arctium tomentosum	51
3. Isolierung einer flavonoiden Verbindung aus Herba Bardanae	54
4. Identifizierung der flavonoiden Substanz	55
a) Quantitative Hydrolyse	55
α) Das Aglykon	56
β) Bestimmung der Zuckerkomponente	56
b) Vergleichende Papierchromatographie	57
c) Nachweis der Stellung der D-Glucose	57
d) UV-Absorptionsspektrum	59
e) Ergebnis	59
B. Zusammenfassung	61
C. Experimenteller Teil	62
D. UV-Absorptionskurven	92
Lebenslauf	99

Einleitung

Analysiert man mit chemischen Methoden die stoffliche Zusammensetzung einer Pflanze, so findet man sie regelmäßig aus Gerüst- und Reservesubstanzen (Kohlehydrate, Eiweiße und Fette) zusammengesetzt. Daneben enthält sie aber auch eine Fülle meist aromatischer Verbindungen, die man seit Kostytschew (1926) als sekundäre Pflanzenstoffe bezeichnet. Die Fähigkeit zur Synthese einer großen Vielzahl verschiedenartigster chemischer Verbindungen, der mannigfaltige Reichtum an Naturstoffen ist geradezu ein Charakteristikum der pflanzlichen Organismen. (K. Paech, 1950).

Man nimmt es allgemein als gegeben hin, daß das Vorkommen an diesen sekundären Inhaltsstoffen von Pflanzenart zu Pflanzenart außerordentlich verschieden ist. So gibt es Stoffe, die man häufig antrifft (ubiquitäre Pflanzenstoffe), andere, die anscheinend wahllos verstreut über das Pflanzensystem erscheinen (Pflanzenstoffe mit sporadischer Verbreitung) und schließlich solche, deren Vorkommen für ein bestimmtes Taxon (Varietät, Species, Genus, Familie) charakteristisch ist. Soll nun die stoffliche Zusammensetzung der Pflanzen als etwas schlechthin Gegebenes angesehen werden oder verbergen sich hinter der Art des Vorkommens (ubiquitär, sporadisch, taxonspezifisch) tiefere Gesetzmäßigkeiten? Zahlreiche dahinzielende Ansätze (z.B. Hegnauer, 1958) mußten mehr oder weniger daran scheitern, daß zu wenig Tatsachenmaterial vorliegt, d.h. daß unsere Kenntnisse über die systematische Verbreitung von Pflanzeninhaltsstoffen viel zu lückenhaft sind.

In unserem Institut befaßt sich eine Arbeitsgruppe mit der Frage nach dem Vorkommen und der Verbreitung taxonspezifischer Pflanzeninhaltsstoffe - speziell phenolischer Art - in mehreren systematisch engen Verwandtschaftskreisen. (E. Winde: "Untersuchungen über die Verbreitung der Pseudoindikane", B. Janiak; "Phytochemisch-pharmakognostische Untersuchungen der Fructus Cardui Mariae", J. Klaffenbach: "Vergleichende pharmakognostische Untersuchung in der Gattung Erythrophleum").

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Kenntnis taxonspezifischer Inhaltsstoffe von Compositen bringen. An charakteristischen Inhaltsstoffen dieser Familie sind bisher bekannt das Inulin, die Phytomelane (merkwürdige kohlenstoffreiche Verbindungen unbekannter Konstitution) und vor allem Sesquiterpene vom Guaianolid-Typus, die in mannigfacher Ausgestaltung als Azulene, Proazulene und Bitterstoffe wie Lactucin, Lactupikrin und Cnicin vorkommen. Lediglich auf einzelne Arten der Compositen beschränkt sind Stoffe wie z.B. die von Janiak (1960) isolierten flavonoiden Silybumsubstanzen und das Lignanglykosid Arctiin.

Die eigenen Untersuchungen befassen sich zunächst mit den charakteristischen Inhaltsstoffen der Früchte von Cnicus benedictus L. unter besonderer Berücksichtigung des Vorkommens phenolischer Bestandteile. Der zweite Teil der Untersuchungen bringt Ergebnisse über die Verbreitung des bisher als artspezifisch angesehenen Compositenbitterstoffes Arctiin.

Das Thema der Arbeit ergab sich aus rein phytochemisch-taxonomischen Überlegungen, angeregt durch die histochemischen Untersuchungen der Fructus Cardui Mariae. B.Janiak stellte dabei fest, daß sich bestimmte Gewebselemente, und zwar die palisadenartig angeordneten Sklerenchymzellen der Samenschale, mit konz. Schwefelsäure rot verfärben. Diese Beobachtung führte zu der Isolierung zweier flavonoider Substanzen mit einem strukturellen Aufbau, der bisher im Pflanzenreich nicht aufgefunden worden war.

Bei der Prüfung der Früchte der der Mariendistel systematisch-botanisch eng verwandten Cnicus benedictus L. mit der gleichen Farbreaktion konnten wir ebenfalls eine intensive Rotfärbung feststellen. Es erschien uns interessant, diese für die Farbreaktion verantwortliche Substanz zu isolieren, zumal bisher keine charakteristischen Inhaltsstoffe aus den Kardobenediktenfrüchten bekannt sind. Während H. A. Hoppe (1958) in seiner "Drogenkunde" lediglich einen Bitterstoff nennt, erwähnt F. Berger (1952) das Vorkommen des Bitterstoffes Cnicin.Hager (1949) ande-

rerseits charakterisiert das Cnicin, für das er eine durch die Ergebnisse von F. Korte (1958) überholte Summenformel von $C_{42}H_{56}O_{15}$ angibt, durch eine Rotfärbung mit konz. Schwefelsäure.

Unter Berücksichtigung dieser Literaturangaben ergab sich zunächst die folgende Fragestellung: Entspricht die erwähnte Substanz aus den Kardobenediktenfrüchten den flavonoiden Verbindungen aus Fructus Cardui Mariae, ist sie evtl. mit Cnicin identisch oder ist ihr eine Lignanstruktur, ähnlich dem Arctiin, aus Früchten der ebenfalls nahe verwandten Arctium Lappa L. isoliert, zuzuerkennen? Letztere Hypothese gründet sich auf bekannte Literaturangaben, daß viele Lignanverbindungen mit konz. Schwefelsäure unter Rotfärbung reagieren.

Zur Lösung dieser Aufgabe sollten nicht nur die Früchte von Cnicus benedictus und Arctium Lappa bearbeitet werden, da auch die Möglichkeit bestand, daß die erwähnten Stofftypen in anderen Pflanzenteilen lokalisiert sind.

Es war auch von Interesse zu erfahren, ob sich die mit Schwefelsäure reagierenden Substanzen bei anderen systematisch eng verwandten Pflanzen finden, um aus diesen phytochemischen Ergebnissen evtl. die morphologische Einordnung der artenreichen Gattungen bestätigen zu können. Aus diesem Grunde wurden die Untersuchungen auf die Cynareae mit ihren beiden Subtriben Carduinae und Centaureinae ausgedehnt. Daneben sollten selbstverständlich auch andere bei der Aufarbeitung der Kardobenediktenfrüchte anfallende Inhaltsstoffe beachtet werden.

Cnicus benedictus L., Kardobenedikte.

Botanik:

Die einjährige, distelartige Pflanze Cnicus benedictus L., (= Centaurea benedicta L., = Calcitrapa benedicta Benth.et Hook) ist systematisch - wegen der seitlichen Anheftungsstelle der Früchte - der Subtribus der Centaureinae zugeordnet. Die Centaureinae gehören der Tribus der Cynareae, diese den Tubuliflorae, einer der beiden Unterfamilien der Compositen an.

Nach G.Hegi (1929) scheint die Pflanze im Altertum keine Bedeutung gehabt zu haben; sie wird zwar bei Dioskurides, Plinius (carduus), Theophrast (knekos), Galen (knikos) erwähnt, jedoch wird von den Autoren nichts über eine medizinische Anwendung ausgesagt. Im Mittelalter erfreute sich das Benediktenkraut, dessen Name Hegi vom Heiligen Benediktus oder von den die Pflanze anbauenden Benediktinermönchen herleitet, großer Beliebtheit. Heute, in der Zeit der modernen Pharmaka und Synthetika, ist sie als Amarum fast obsolet. Die Heimat der Kardobenedikte ist das europäische Mittelmeergebiet und Vorderasien; in die mitteleuropäischen Gebiete und in viele Überseestaaten (Nord- und Südamerika, Südafrika) sind die verwilderten Kulturen wahrscheinlich eingeschleppt worden.

Die Fructus Cardui benedicti, Spinnsamen, Heil-, Magen- oder Bitterdistelsamen, sind leicht gekrümmt, etwa 8-12 mm lang, 5 mm breit und von gelblich-grauer Farbe. F.Berger (1952) beschreibt die Früchte in seinem "Handbuch der Drogenkunde" folgendermaßen: "Die Spinnsamen sind an den kielartigen, dichten, etwa 20 Längsrippen und an dem langen, dem Fruchtscheitel ansitzenden, spreizenden Schopf aus 10 hellen Borsten und einem aus alternierenden kürzeren Zähnen bestehenden inneren Stachelkranz (äußerer und innerer Pappus) leicht zu erkennen. Der obere Fruchtrand ist außerdem durch einen zehnzackigen, niedrigen Wulst, in den die Rippen einmünden, gekennzeichnet. Am Grund ist die Frucht schräg abgestutzt. Der doppelte Pappus ist an

der Droge oft abgefallen. Die sehr feste Fruchtwand umschließt die Samenschale und einen glasig aussehenden großen Embryo, dessen Hauptmasse die Cotyledonen ausmachen."

Chemie:

C. Wehmer (1929) nennt als Inhaltsstoffe 24-28,3 % fettes Öl mit 89,8 % ungesättigten flüssigen Fettsäuren (Ölsäure ca. 74 %, Linolsäure 26 %) und 3,68 % gesättigten festen Fettsäuren (40 % Stearin- und 60 % Palmitinsäure). H.A. Hoppe (1958) erwähnt in seiner "Drogenkunde" einen Bitterstoff, ohne aber nähere Angaben darüber zu machen. Im "Handbuch der Drogenkunde" von F. Berger (1952) ist neben dem fetten Öl und Eiweiß der "glykosidische" Bitterstoff Cnicin angeführt. Die Droge, die heute pharmakologisch keinerlei Bedeutung hat, wurde früher als Purgans, Laxativum und Vomitivum gebraucht. In der Volksmedizin hat man die Früchte (Stechkörner) gegen Seitenstechen ("Metrorrhagie") genommen. Im ersten Weltkrieg wurden die Früchte zur Ölgewinnung herangezogen; den Preßrückstand verwendete man als hochwertiges Futtermittel.

A. HAUPTTEIL

I. Cnicussubstanz C aus Früchten von Cnicus benedictus L.

1. Vergleichende Voruntersuchungen.

Das wichtigste Ziel der vorliegenden Untersuchungen war in der Einleitung bereits umrissen worden. Aufgrund unserer taxonomischen Überlegungen mußte eine Klärung herbeigeführt werden, ob die sich mit konz. Schwefelsäure rot färbende Substanz aus den Kardobenediktenfrüchten in einem chemischen Verwandtschaftsverhältnis zu der flavonoiden Verbindung (E_5) aus den Fructus Cardui Mariae steht, oder ob ihr eine Lignan-Konstitution, ähnlich dem Arctiin aus Klettenfrüchten, zuzuschreiben ist; in die Betrachtungen einbezogen werden mußten ferner die Literaturangaben der oben genannten Autoren, die Cnicin als Inhaltsstoff der Fructus Cardui benedicti angeben. Andererseits bestand natürlich die Möglichkeit, daß die interessierende Substanz mit keiner der genannten Verbindungen in struktureller Beziehung stand.

Die erste Hypothese konnte schon nach unseren einleitenden qualitativen Untersuchungen ausgeschlossen werden, nachdem wir weder bei den Reagenzglas-Versuchen mit Hilfe von Reduktionsproben noch papierchromatographisch flavonoide Substanzen feststellen konnten. Damit schieden für uns weitere Vergleiche mit der von B. Janiak (1960) isolierten flavonoiden Substanz E_5 aus.

Weitere Aufschlüsse ergaben sich aus einem papierchromatographischen Vergleichstest von Methanolextrakten aus Fructus Cardui benedicti, Fructus Arctii Lappae und Herba Cardui benedicti. Eine wertvolle Hilfe waren uns dabei die definierten Angaben von F. Korte (1958) nach der kristallinen Reindarstellung des Cnicins aus handelsüblichem Kardobenediktenkraut. Zum besseren Verständnis sollen einige charakteristische Daten dieser Substanz genannt werden:

Summenformel: $C_{25}H_{32}O_9$ (Molekular-Gewicht nach Rast 459)

Schmelzpunkt: 160°C.

Optische Drehung $[\alpha]_D = +145^\circ$ (Methanol)

UV - Absorption λ_{max} = 210 mμ log ε = 4,51 (Methanol)
R_F-Wert : o,75 (System: Methanol - Wasser; 2:8)

Auf das letztgenannte Kriterium gestützt, versuchten wir einen vorläufigen Hinweis zu erhalten, indem wir die drei alkoholischen Extrakte in dem von F. Korte angewandten Lösungsmittelgemisch chromatographierten; als Bezugssystem diente uns dabei die Farbreaktion mit konz. Schwefelsäure.

Wir erwarteten selbstverständlich keine genaue Reproduzierbarkeit des von F. Korte für Cnicin angegebenen R_F-Wertes und waren umso mehr überrascht, als wir auf dem Chromatogramm bei Betrachten vor der Analysenquarzlampe +) bei allen drei Extrakten eine als dunklen Fleck sich zeigende Substanz mit der gleichen Steighöhe von R_F= o,75 registrieren konnten. Die Farbreaktion mit konz. Schwefelsäure erlaubte nun, eine weitere Differenzierung vorzunehmen: die Substanzen aus Kardobenedikten - und Klettenfrüchten färbten sich dabei spontan rotviolett, während die als Cnicin vermutete Verbindung nur eine schwache Gelbfärbung erkennen ließ.

Nach diesen papierchromatographischen Voruntersuchungen resultierte nun folgerichtig die Vermutung, daß das Cnicin ebenfalls aus den Untersuchungen ausgeschlossen werden kann, während andererseits in chemischer Hinsicht nach wie vor ein Zusammenhang zwischen der Substanz aus Fructus Cardui benedicti und dem Lignankörper Arctiin aus Klettenfrüchten möglich war. Die endgültigen Beweise konnten selbstverständlich erst nach der Isolierung der entsprechenden Stoffe und Vergleich ihrer physikalischen Daten gegeben werden, zumal noch nicht eindeutig feststand, ob die Verbindung aus den Klettenfrüchten mit dem R_F-Wert o,75 überhaupt dem Arctiin zukam.

+) Klein-UV-Analysenlampe PULA (emittiert besonders Licht der Wellenlänge 260 mμ)

2. Die Isolierung der Cnicussubstanz C aus Fructus Cardui benedicti.

a) Einleitende Voruntersuchungen.

Die gezielte chemische Aufarbeitung einer Droge bedarf für die Reindarstellung eines Naturstoffes eine orientierende Übersicht über die ihn begleitenden Inhaltsstoffe; dazu ist die Papierchromatographie nach Auswahl gut trennender Lösungsmittelsysteme die Methode der Wahl. Ihre Ergebnisse vermögen nicht nur bei der Auffindung des geeigneten Extraktionsmittels wertvolle Hinweise zu geben, sondern lassen auch bei der fraktionierten Extraktion einer Droge eine genaue Verfolgung der einzelnen Verfahrensschritte zu.

Bei der Anwendung von Methanol als Extraktionsflüssigkeit war infolge des guten Lösungsvermögens dieses organischen Lösungsmittels eine Vielzahl von Inhaltsstoffen zu erwarten, die nur mit Hilfe der zweidimensionalen Papierchromatographie befriedigend voneinander getrennt werden konnten. Wir benutzten zur Vortrennung des Gesamtauszuges mit gutem Erfolg das bekannte Partridge-Gemisch (n-Butanol-Eisessig-Wasser) und in der zweiten Dimension 15 %ige Essigsäure. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die einzelnen Inhaltsstoffe:

Tabelle 1

Lösungsmittelsystem I		Lösungsmittelsystem II	
R_F-Wert	Farbe im UV-Licht	R_F-Wert	Farbe im UV-Licht
0,18	blau	0,34	blau
0,25	dunkelblau	0,41	dunkel
0,28-0,43	blau	0,51	blau
0,49	blau	0,60	blau
0,53-0,89	blau	0,71	blau
		0,79	blau
		0,82	blau
		0,84	dunkel (kw UV)
		0,92	blau

Die in der Tabelle 1 angeführten Substanzen fluoreszierten im UV-Licht alle mehr oder minder stark blau. Vor der Purin-Lampe [+)] konnte im Lösungsmittelsystem II ein Fleck vom R_F-Wert = o,84 ausgemacht werden, der nach dem Behandeln des Chromatogramms mit konz. Schwefelsäure als die uns interessierende Verbindung erkannt wurde. Im Lösungsmittelsystem I war die Substanz völlig von blau fluoreszierenden Begleitstoffen überdeckt.

Die konz. Schwefelsäure war zwar zur Identifizierung der gesuchten Substanz als Reagens geeignet, doch war ihre Anwendung insofern von Nachteil, als sie das Papier zerstörte, und die Chromatogramme nicht aufbewahrt werden konnten. Bei der Suche nach einem anderen charakteristischen Sprühmittel erhielten wir nach Prüfung vieler Farbreaktionen mit Antimontrichlorid in Chloroform befriedigende Resultate: die gesuchte Substanz färbte sich mit diesem Reagens ebenfalls rotviolett an; damit hatten wir jetzt eine verbesserte Methode zum Nachweis der gesuchten Verbindung zur Verfügung.

Zur Auffindung des für die Isolierung der Substanz geeigneten Lösungsmittels waren wiederum Voruntersuchungen nötig. Das Extraktionsmittel war nach Beachtung folgender Kriterien auszuwählen:

1. das Lösungsmittel muß die Substanz schnell und quantitativ aus der Droge herauslösen,
2. eine Aufnahme von Begleitstoffen soll nach Möglichkeit eingeschränkt werden,
3. der Siedepunkt des organischen Lösungsmittels soll nicht allzu hoch sein, damit beim Einengen des Auszuges höhere Temperaturen vermieden werden können und
4. muß das Lösungsmittel chemisch indifferent sein, so daß bei der Extraktion keine sekundären chemischen Prozesse die Substanz verändern können.

Unter Berücksichtigung dieser, an das Lösungsmittel gestellten Anforderungen, führten wir mit einer kleinen Drogenmenge eine fraktionierte Extraktion im Soxhlet mit folgenden organischen Solventien durch:

+) Klein-UV-Analysenlampe PULA

1. Petroläther,
2. Chloroform,
3. Äther,
4. Essigester,
5. Methanol und
6. Wasser.

Die Extraktionszeit wurde absichtlich kurz bemessen, so daß die Substanz mit keinem Lösungsmittel quantitativ herausgelöst werden konnte. Eine papierchromatographische Kontrolle der einzelnen Fraktionen zeigte die Löslichkeit in folgenden Solventien:

1. Chloroform,
2. Essigester,
3. Methanol,
4. Wasser.

Aufgrund der verschiedenen Polarität der einzelnen Lösungsmittel und des sich daraus ergebenden Lösungsvermögens, vermochten wir jetzt eine weitere Aussage über die uns interessierende Substanz zu machen, die für die Ausarbeitung des Trennungsganges bei der Reindarstellung berücksichtigt werden konnte: die Verbindung war in Petroläther und Äther praktisch nicht löslich, und folglich konnte durch diese lipophilen Lösungsmittel schon eine gewisse Vorreinigung des Gesamtextraktes vorgenommen werden. Der Fortgang der Arbeit, der auf die Darstellung einer größeren Substanzmenge gerichtet war, lag nun durch die präparativen und papierchromatographischen Vorarbeiten eindeutig fest.

Zur Extraktion der Substanz wählten wir bei der Reindarstellung Methanol, obwohl bei Anwendung von Chloroform oder Essigester sicher mit einer geringeren Menge von Begleitsubstanzen zu rechnen war. Andererseits legten wir auf eine quantitative Ausbeute den größeren Wert. Die Löslichkeit einer Reinsubstanz ist nicht vergleichbar mit der in der Pflanzenzelle; die Gegenwart von Begleitstoffen wie Membransubstanzen oder auch Gerbstoffen, Saponinen u.a. schafft ganz andere Bedingungen.

b) Nach diesen wegweisenden Voruntersuchungen konnten wir nun folgenden Isolierungsgang ausarbeiten:

Die feingemahlenen Kardobenediktenfrüchte wurden zur Entfernung des fetten Öls und anderer lipophiler Begleitsubstanzen mit Petroläther (= Fraktion F_1) und Äther (= Fraktion F_2) vorextrahiert und anschließend mit Methanol (= Fraktion F_3) erschöpfend ausgezogen. Nach Einengen des alkoholischen Extrakts wurde der harzige Rückstand in mehreren Anteilen mit heißem Wasser digeriert, die wäßrige Phase nach Klärung im Vakuum eingeengt und dann mit Äthylazetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Fraktionen wurden unter vermindertem Druck auf ein bestimmtes Volumen konzentriert, über Natriumsulfat getrocknet und längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt. Nach einigen Tagen kristallisierte die Substanz in Form von schmutzigweißen Nadelaggregaten aus.

Da es uns trotz mehrmaliger Umkristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln nicht gelang, eine hartnäckige, im UV-Licht blau fluoreszierende, Begleitsubstanz ohne größere Substanzverluste abzutrennen, versuchten wir eine weitere Reinigung an einer Polyamidsäule zu erzielen.

c) Reinigung der Cnicussubstanz C an einer Polyamidsäule.

Die Verwendung von Polyamid als Adsorbens bei säulenchromatographischen Verfahren ist erst in den letzten Jahren bekannt geworden. H. Batzer (1952), der wohl als erster die Brauchbarkeit von Polyamid als Adsorbens erkannt hat, benutzte es bei quantitativen Gerbstoffbestimmungen anstelle von Hautpulver. Grundlegende Arbeiten über Polyamid als Adsorbens bei der Säulenchromatographie haben V. Carelli, A.M. Liquori und A. Mele (1955) veröffentlicht; bei der Trennung homologer Phenole und Fettsäuren gaben sie eine theoretische Begründung der Adsorptionskräfte des Polyamids. Danach erfolgt die adsorptive Bindung über eine Ausbildung von Wasserstoffbrücken, die um so starker ist, je mehr dazu befähigte funktionelle Gruppen im Molekül vorhanden sind. W. Grassmann, H. Hoermann

und A. Hartl (1956) haben die bei der Bearbeitung einfacher Phenole erkannten Gesetzmäßigkeiten erläutert und vor allem auf die überlegene Adsorptionskapazität des Polyamid hingewiesen.

Für die Reinigung unserer Substanz wählten wir eine Säule von 35 cm Höhe und 3 cm Durchmesser mit etwa 50 g Polyamidpulver als Füllmaterial; eluiert wurde mit verdünntem Methanol.

Schon nach einigen Stunden war unsere Substanz im Eluat nachzuweisen, während ein blau fluoreszierender Begleitstoff in der Säule fixiert blieb. Bei der schnellen Wanderungsgeschwindigkeit unserer Substanz waren für sie nach den Ergebnissen der oben genannten Autoren keine oder höchstens eine phenolische Hydroxylgruppe zu postulieren; die Verunreinigung dagegen dürfte infolge ihrer langsamen Wanderung polyphenolischer Natur sein.

Nach dem Einengen des Eluats kristallisierte die Substanz in farblosen Kristallbüscheln aus.

d) Einige Eigenschaften der Cnicussubstanz C.

Die Verbindung zeigte nach dem Trocknen einen konstanten Schmelzpunkt von 118°C; die Einheitlichkeit und Reinheit ergab sich nach einer papierchromatographischen Prüfung.
Die Substanz schmeckt intensiv bitter.
Die Substanz löste sich schwer in kaltem, sehr gut in heißem Wasser; in Methanol und Äthanol geht sie leicht in Lösung; Chloroform und Essigester zeigen besonders nach Erwärmen ein gutes Lösungsvermögen. In Petroläther, Benzol, Äther und Aceton ist die Substanz praktisch unlöslich.

Im Tüpfeltest mit konz. Schwefelsäure nehmen die Kristalle sofort eine rotviolette Färbung an, die sich später auf die ganze Säurephase ausdehnte.

Die Löslichkeitsverhältnisse ließen das Vorliegen eines Glykosids vermuten. Tatsächlich gelang uns mit Hilfe von Anthronreagens (o,2 % Anthron in konz. Schwefelsäure) der Nachweis einer Zuckerkomponente; Fehlingsche Lösung andererseits wurde nicht reduziert.

Nach diesen orientierenden Vorarbeiten versuchten wir durch Nachweis der hydrolytischen Spaltprodukte die Glykosidhypothese zu stützen.

e) Hydrolyse der Cnicussubstanz C.

Glykoside sind ihrer chemischen Natur nach Acetale, und wie diese mehr oder minder leicht durch Säuren spaltbar.

Wir erzielten nach den üblichen Hydrolysebedingungen mit o,2 n-Schwefelsäure eine quantitative Spaltung in Aglykon und Zuckeranteil. Damit war zwar eine Glykosidstruktur bewiesen, jedoch noch nichts über die konfigurative Bindung der beiden Teilstücke ausgesagt. Zur Beantwortung dieser Frage führten wir in einem Natriumazetat - Essigsäure - Puffergemisch eine enzymatische Hydrolyse mit β-Glucosidase durch. Diese Carbohydrase besitzt wie alle Fermente stereochemische Spaltungsspezifität und hydrolysiert nur β-glucosidische Bindungen, die in nahezu allen natürlichen Glykosiden vorliegen.

Wir konnten auch hier nach 24 Stunden papierchromatographisch eine quantitative Spaltung feststellen.

α) Das Aglykon.

Das Aglykon wurde aus den entsprechenden Hydrolyseflüssigkeiten mit Äther entzogen und zeigte nach Umkristallisation einen konstanten Schmelzpunkt von 102°C. Die farblosen Kristalle lösten sich leicht in Chloroform, Äther und Methanol; in Wasser waren sie praktisch unlöslich. Das Aglykon schmeckte nicht mehr bitter. Die nach der Spaltung nunmehr freie Hydroxylgruppe konnte mit Hilfe von Eisen-3-chlorid nachgewiesen werden: es entstand ein blaugrün gefärbter Eisenkomplex.

β) Der Zuckeranteil.

Die abgespaltene Zuckerkomponente wurde einmal papierchromatographisch untersucht, und das Ergebnis durch Darstellung eines spezifischen Derivates als Osazon gesichert.

Wir neutralisierten das vom Aglykon befreite Hydrolysat mit Bariumkarbonat und chromatographierten die konzentrierte Zuckerlösung in zwei verschiedenen Lösungsmittelgemischen. In beiden Systemen erfolgte keine Trennung von mitlaufender authentischer D-Glucose.

Das nach den üblichen Verfahren hergestellte Osazon schmolz bei 208 - 209°C und zeigte im Mischschmelzpunkt mit analog gewonnenem Glucoseosazon keine Depression.

Die quantitative Berechnung der hydrolytischen Spaltung ergab 66,8 % Aglykon; der Zuckeranteil betrug demnach 33,2 %. Aus diesen Werten läßt sich die Substanz als β-Monoglucosid definieren.

f) Spezifische Drehung.

Die optische Aktivität ist für jede organische Verbindung, vorausgesetzt, daß sie mindestens ein asymmetrisches Kohlenstoffatom im Molekül besitzt, eine spezifische Konstante, die, soweit das Drehungsvermögen unter gleichen Bedingungen gemessen wird, zur näheren Charakterisierung der Substanz herangezogen werden kann.

Das von uns isolierte Glykosid war optisch aktiv und zeigte eine Linksdrehung von $[\alpha]_D^{20^\circ} = -38{,}8^\circ$ (Chloroform).

g) Elementaranalyse.

Nach Ausführung der ersten Analyse stellten wir fest, daß die Substanz hartnäckig Kristallwasser festhielt. Bei weiterem Trocknen (80°C) verlor sie 1 Mol Wasser, so daß sich die Summenformel

$$C_{27} H_{34} O_{11} \cdot H_2 O$$

errechnen läßt.

Ber.	C 58,69 %	H 6,57 %	O 34,75 %
Gef.	C 59,0 %	H 6,8 %	O 34,2 %

Die bisher erzielten chemischen Ergebnisse und physikalischen Daten bekräftigten, bis auf den um 6°C differierenden Schmelzpunkt des Glykosids, unsere Vermutung, daß die von uns isolierte glykosidische Substanz aus den Kardo-

benediktenfrüchten mit dem in Klettenfrüchten enthaltenen Lignanglucosid Arctiin identisch sei: Wir gaben uns jedoch mit einem Vergleich der Literaturwerte nicht zufrieden und erachteten es als notwendig, das Arctiin aus den Klettenfrüchten zu isolieren, um beide Verbindungen in eigenen Versuchen gegenüberstellen zu können.

3. Isolierung von Arctiin aus Fructus Bardanae.

Arctiin war das erste natürliche Lignanglykosid, das im Pflanzenreich aufgefunden wurde. Die Japaner J. Shinoda und M.Kawagoye (1929) isolierten das Heterosid zusammen mit seinem Aglykon Arctigenin aus den Früchten von Arctium Lappa L., der sog. großen Klette. Die Autoren entfetteten die Früchte mit Äther und extrahierten die Droge mit Alkohol; nach dem Einengen des Extrakts nahmen sie den Rückstand in heißem Wasser auf und reinigten die wäßrige Phase durch eine Bleiazetatfällung; zur Entfernung des überschüssigen Bleis behandelten sie das Filtrat mit Schwefelwasserstoff. Beim Konzentrieren der Lösung erhielten sie Arctiin in Form von farblosen Nadeln mit dem Schmelzpunkt 112°C. Zur Hydrolyse spalteten Shinoda und Kawagoye das Glykosid mit 29 %iger Schwefelsäure in das Aglykon Arctigenin (Schmelzpunkt 102°C) und die Zuckerkomponente Glukose.

Zur Isolierung des Arctiins aus Klettenfrüchten wendeten wir mit Erfolg die gleiche Methode an, die wir bei der präparativen Reindarstellung der sich mit Schwefelsäure rot färbenden Substanz aus den Fructus Cardui benedicti ausgearbeitet hatten. Durch die sinnvolle Kombination klassischer Ausschüttelungsmethoden mit modernen chromatographischen Trennverfahren umgingen wir die von den Japanern benutzte Bleiazetatfällung, da durch sie erhebliche Substanzverluste entstehen, und sich andererseits Zersetzungsprodukte bilden können.

Überrascht stellten wir fest, daß das von uns isolierte Arctiin einen um 6°C höheren Schmelzpunkt hatte als bisher in der Literatur angegeben. Diese Differenz könnte ihre Ursache haben in der Anwendung verschiedener Kristallisa-

tionsmedien oder durch eine variierende Arbeitstechnik, bedingt durch moderne Weiterentwicklungen der gebräuchlichen Schmelzpunktapparate. Wir neigen dagegen eher zu der Vermutung, daß das durch Chromatographie an Polyamid isolierte Arctiin in einem größeren Reinheitsgrad vorlag. Eigenartigerweise stimmte der Schmelzpunkt des Arctigenins, das wir durch Hydrolyse mit o,2 n-Schwefelsäure abgespalten und nur durch Umkristallisieren gereinigt hatten, mit dem Literaturwert von 1o2°C überein. Dieses Ergebnis bestätigt die oben geäußerte Hypothese und spricht für die Überlegenheit moderner chromatographischer Trennverfahren.

4. Vergleichschromatographie der Cnicussubstanz C und des Aglykons aus Cnicussubstanz C bzw. Arctiin und Arctigenin.

Als weiteren Beweis für die Identität der von uns gefundenen Substanz aus Kardobenediktenfrüchten und des nach einer neuen, verbesserten Methode isolierten Arctiins aus Klettenfrüchten führten wir chromatographische Vergleichsuntersuchungen durch.

Die Identität zweier Substanzen kann dann als gesichert gelten, wenn die in mehreren, verschieden polaren Lösungsmittelsystemen ermittelten R_F-Werte übereinstimmen; eine optimale Sicherheit bietet die Anwendung von Mischchromatogrammen. Da für Lignane keine spezifischen Nachweisreaktionen bekannt sind, mußten wir zur Kenntlichmachung der Flecken auf allgemeine Gruppenreagenzien wie Antimontrichlorid, diazotierte Sulfanilsäure und konz. Schwefelsäure zurückgreifen. Die Aggressivität der Schwefelsäure veranlaßte uns, die Dünnschichtchromatographie mit einem anorganischen Adsorbens - auf die wir später noch näher eingehen werden - anzuwenden.

In keinem der insgesamt vier benutzten Lösungsmittelsysteme erfolgte eine Auftrennung der beiden Glykoside und ihrer Aglyka; auch die mit Hilfe der Reagenzien erzielten Färbungen im Tages- und UV-Licht betonten die Identität der Substanzen. Eine Tabelle der R_F-Werte und Farbreaktionen ist im Versuchsteil zusammengestellt.

5. UV-Absorptionsspektren.

Die UV-Absorptionsspektren der einzelnen Lignane sind nicht sehr charakteristisch und wenig differenziert. Die Lage der Maxima und Höhe der spezifischen Extinktionskoeffizienten lassen nur eine Aussage über die Reinheit und Identität der gemessenen Substanzen zu; strukturelle Unterschiede und die Art der Substituenten können auf diesem Wege nicht bestimmt werden. Diese Differenzierungen verlangen die Aufnahme eines IR-Absorptionsspektrums. Die spektrographischen Daten der Cnicussubstanz C und des Arctiins zeigen im ultravioletten Wellenbereich übereinstimmende Werte: Maxima und Minima sind in der Lage der Banden identisch; die geringen Differenzen der Extinktionskoeffizienten sind lediglich konzentrationsbedingt.

In Tabelle 2 sind die Eigenschaften und physikalischen Daten des von uns in Kardobenediktenfrüchten gefundenen Glykosids und des nach einer neuen, verbesserten Methode aus Klettenfrüchten isolierten Arctiins vergleichsweise zusammengestellt.

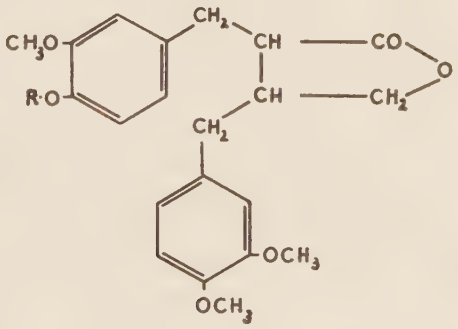
Tabelle 2

	Cnicussubstanz C aus Fruct.Card.ben.	Arctiin aus Fructus Bardanae	
	eigene Untersuchungen	eig.Unters.	Literaturwerte
Schmelzpunkte:			
Glykosid:	118° C	118° C	112° C
Aglykon :	102° C	102° C	102° C
Zuckerkomponente:	D-Glukose β-Stellung	D-Glukose β-Stellung	D-Glukose
Spezifische Drehung	$[\alpha]_D^{20} = -38,8^\circ$	$[\alpha]_D^{20} = -38,7^\circ$	$[\alpha]_D^{18} = -38,8^\circ$
UV-Absorption:			
Maxima (mμ)	211 230 280	211 230 280	
Minima (mμ)	218 252	218 252	
R_F-Werte +)			
System I:	0,62	0,62	
System II:	0,84	0,84	
Farbreaktionen			
konz. H_2SO_4	rotviolett	rotviolett	
$SbCl_3$ (i.$CHCl_3$)	rotviolett	rotviolett	

Zeichenerklärung +) Lösungsmittelsysteme siehe Tabelle 2 Versuchsteil

6. Die Konstitution des Arctiins.

Shinoda und Kawagoye (1929) hatten nach einer Elementaranalyse für Arctiin die Bruttoformel $C_{28}H_{38}O_{12} \cdot H_2O$ und für das Aglykon Arctigenin $C_{22}H_{26}O_6$ angegeben. Omaki (1935) konnte die Summenformeln später auf $C_{27}H_{34}O_{11} \cdot H_2O$ und $C_{21}H_{24}O_6$ berichtigen.
Die Struktur des Arctiins vermochte Omaki ebenfalls aufzuklären; er bewies, daß das monomethylierte Aglykon (= Monomethylarctigenin) mit dem bekannten Matairesinoldimethyläther identisch ist, woraus sich die folgende Konstitutionsformel für Arctiin ergab:



Arctiin

Die phenolische Hydroxylgruppe ist durch Diazoäthan leicht zu veräthern; Acetylierung mit Acetanhydrid und Pyridin führt zu einem nicht kristallisierenden Acetylarctigenin. Bromierung in Eisessig ergibt ein Tribromderivat (Smp. 194-195°C), das bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat 6-Bromveratrumsäure entstehen läßt.

Die Stellung der Hydroxylgruppe wurde durch Abbau- und Cyclisierungsreaktionen erkannt. Der Äthyläther des Arctigenins läßt sich zu Veratrumsäure und Vanillinsäureäthyläther oxydieren (Shinoda, 1929). Das gleiche Ausgangsprodukt erleidet durch Bleitetraacetat in

Essigsäure eine Cyclodehydrierung zu zwei Naphthalenderivaten, deren Struktur Haworth und Kelly (1936) durch Synthese beweisen konnten. Aus diesen Untersuchungen ergab sich die para-Stellung der Hydroxylgruppe zum Verknüpfungspunkt der Seitensubstitution. Das nicht kristallisierende Arctigeninazetat (Smp. 50 - 60° C) wird durch Bleitetraazetat zu einem Conidendrinmonomethylätherazetat dehydriert, das nach Deazetylierung Cycloarctigenin (Smp. 239 - 240° C) entstehen läßt. Die Methylierung dieses Reaktionsproduktes ergibt Conidendrindimethyläther (Omaki, 1937). Arctigenin ist gegenüber Alkalien empfindlich und läßt sich durch längeres Erhitzen mit Kalilauge zu rechtsdrehendem Isoarctigenin (Smp. 92° C) isomerisieren (Omaki, 1935, 1937).

Cycloarctigenin erleidet eine ähnliche Isomerisierung durch Erhitzen mit alkoholischem Natriumäthoxyd zu einem optisch inaktiven Lakton, dem Isocycloarctigenin (Smp. 229 - 230° C).

7. Prüfung des Arctiins auf antibakterielle Wirksamkeit (in vitro).

Einige der bisher bekannten Lignane besitzen physiologische Wirksamkeit. Die Guajaretsäure und Nordihydroguajaretsäure (NDGA) wurden früher als Antioxydantien gebraucht. Arsarinin und Sesamin sind als Synergisten für Insektizida bekannt. Die Lignanverbindungen der im Himalajagebiet verbreiteten Berberidacee Podophyllum emodi Wall. und der in Nordamerika heimischen Podophyllum peltatum L. finden wegen ihrer anthelmintischen, laxierenden und emetischen Eigenschaften in diesen Ländern medizinische Verwendung. Neuere Ergebnisse betonen eine mitosehemmende Wirkung dieser Lignansubstanzen.

Die vielseitige und unterschiedliche Aktivität der genannten Verbindungen ist im Hinblick auf die verwandte Struktur dieser Naturstoffe bemerkenswert. Für die physiologische Wirksamkeit sind sicher die Laktongruppierungen verantwortlich zu machen.

Für das Bitterstoffglykosid Arctiin sind bisher keine derartigen Untersuchungen bekannt geworden.

Mehrere Autoren (Cavallito, Bailey und Kirchner, 1945; Osborn, Abraham, Crowfoot und Joseph, 1946; Plourde und

Mockle, 1960) isolierten nach verschiedenen Methoden aus Blättern von Arctium minus ein antibiotisch wirksames Prinzip. Die wohl identischen Verbindungen, deren genaue Konstitution noch nicht gesichert ist, haben Laktoncharakter und sind gegen grampositive Bakterien wirksam.

Angeregt durch diese Untersuchungen testeten wir das Arctiin auf antibakterielle Aktivität gegen das grampositive Bakterium Staphylococcus aureus.

Mit Hilfe des Loch-Testverfahrens, dessen Ausführung im Versuchsteil näher beschrieben wird, kamen wir zu dem Ergebnis, daß dem Arctiin keine bakteriostatische Wirksamkeit gegen grampositive Erreger zukommt, da selbst verhältnismäßig hohe Konzentrationen des Glykosids das Wachstum von Staphylococcus aureus nicht zu hemmen vermochten.

I. Isolierung eines Phytosterolins.

Schon während der Extraktion der Kardobenediktenfrüchte mit Äther (Fraktion F_2) fiel aus der Lipoidfraktion eine Substanz aus, die nach dem Umkristallisieren einen Schmelzpunkt von 297 - 300°C zeigte und alle Farbreaktionen der Sterine gab. Die farblosen Kristallblättchen des auf kaltem Wege hergestellten Acetats schmolzen bei 162 - 163°C.

Diese Ergebnisse und der positive Ausfall der spezifischen Farbreaktion nach Whitby (1923) ließen das Vorliegen eines Phytosterolins vermuten, einer Klasse von Glykosiden, deren Aglykon von einem Sterin gestellt wird. Es ist bekannt, daß die sich vom Cyclopentanoperhydro-phenanthren ableitenden, ubiquitär verbreiteten, Phytosterine meist als freie Alkohole oder als Fettsäureester vorkommen, seltener, an einen Zucker gebunden, als Glykoside.

Die erste derartige Verbindung, die im Pflanzenreich gefunden wurde, war das von Power und Mitarbeitern (1908) aus der Convolvulacee Ipomoea purpurea isolierte Ipuranol.

Später wurden weitere dieser Steringlykoside in einigen Pflanzen aufgefunden und näher beschrieben:

Lippianol	aus	Lippia scaberrima	Smp. 300°C
Grindelol	aus	Grindelia camporum	Smp. 256°C
Cucurbitol	aus	Cucurbita citrullus	Smp. 260°C
Trifolianol	aus	Trifolium pratense	Smp. 295°C
Anonol	aus	Anona muricata	Smp. 294°C
Cluytianol	aus	Taraxacum officinale	Smp. 297°C
Bryonol	aus	Bryonia dioica	Smp. 210°C

Die zum Teil erheblich differierenden Schmelzpunkte der einzelnen Substanzen sind wahrscheinlich durch qualitative und quantitative Variationen in der Zusammensetzung der Aglyka bedingt, analog den meist uneinheitlich zusammengesetzten Phytosterinen.

Die Glykosidstruktur dieser hochschmelzenden, polyhydrierten Substanzen bewiesen Power und Salway (1913) durch hydrolytischen Abbau in Aglykon und Zucker; sie identifizierten die Spaltprodukte als Sitosterin und Glucose. Thornton, Kraybill und Broome (1941) empfahlen bei der

Spaltung der Steroline die Anwendung milder Hydrolysebedingungen, um eine Zersetzung des Kohlehydrats zu vermeiden. Es gelang ihnen, das Sojabohnen-Sterolin mit 2 %iger äthanolischer Salzsäure zu spalten und das Aglykon über die Bromacetate in die beiden Komponenten Stigmasterin und Sitosterin aufzutrennen.

Zur Charakterisierung des von uns isolierten Sterolins hydrolysierten wir das Glykosid mit o,2 n-äthanolischer Salzsäure und erhielten ein Aglykon vom Schmelzpunkt 134°C und Glucose, die wir papierchromatographisch in zwei Lösungsmittelsystemen, durch Schmelzpunkt des Osazons und durch Mischschmelzpunkt mit authentischem Glucoseosazon leicht identifizieren konnten.

Der Schmelzpunkt des Aglykons ließ auch in diesem Falle eine Identität mit β-Sitosterin vermuten, obgleich er im Verhältnis zum Literaturwert (β-Sitosterin = 138 - 141°C) einige Grade zu tief lag.

Unsere geringe Ausbeute erlaubte keine weitere Reinigung des Rohsterins nach den üblichen Methoden. Tunmann (1956) z.B. vermochte den Schmelzpunkt seines aus Potentilla anserina isolierten Sterins nach den Angaben von Bonstedt (1928) durch 2omaliges Umkristallisieren und Überführen in das Acetylderivat, das er ebenfalls 3omal umgelöst hat, auf 139°C zu erhöhen. Bereits 1933 benutzten Winterstein und Stein chromatographische Adsorptionsmethoden, um Steroide von Begleitsubstanzen zu befreien.

Auch wir versuchten daher, unser Aglykon durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxyd nach Brockmann zu reinigen. Bei nur geringem Substanzverlust konnten wir aus dem Eluat das Aglykon in reiner Form gewinnen; der Schmelzpunkt von 137 - 138°C stimmte nun mit dem Literaturwert gut überein.

1. Einige Eigenschaften des Sterolinaglykons.

Der Schmelzpunkt des Acetats lag bei 122 - 123°C und differierte damit um etwa 5°C mit analog acetyliertem authentischem β-Sitosterin.

Das Sterolinaglykon war mit Digitonin fällbar, ein Beweis für eine freie β-ständige Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 3.

1. Farbreaktionen.

a) Nach Liebermann - Burchardt;
b) nach Salkowski.

Der wohl gebräuchlichste und wichtigste Nachweis für Phytosterine gründet sich auf die von Liebermann (1885) gefundene und von Burchardt (1889) weiter entwickelte Farbreaktion mit konz. Schwefelsäure und Essigsäureanhydrid. Brieskorn und Capuano (1953) kamen bei der Aufklärung des Chemismus der Farbreaktion zu der Erkenntnis, daß unter der wasserabspaltenden und isomerisierenden Wirkung der konz. Schwefelsäure ein konjugiertes Dien gebildet wird. Eine Addition von zwei Molekülen Schwefelsäure an das Dien ergibt die rote Farbreaktion nach Salkowski; bei der Anlagerung von einem Mol Säure, die bei der Liebermann - Burchardt - Reaktion infolge der Verdünnung mit Essigsäureanhydrid (oder anderen wasserfreien Lösungsmitteln) nur möglich ist, erfolgt der charakteristische Farbwechsel nach Grün. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit (1959) beweisen die Autoren, daß am Ablauf der Reaktion bestimmte Substitutionsgruppierungen von Bedeutung sind und infolgedessen die verschiedenartige Reaktionsintensität der einzelnen Sterine und Triterpene erklärt werden kann.

Während bei der Prüfung unseres Aglykons mit der Liebermann-Burchardt-Reaktion das bekannte Farbspiel von Rot über Violett und Blau nach Grün deutlich zu erkennen war, zeigte die Reaktion nach Salkowski eine Unregelmäßigkeit, die bei einer Vergleichsprobe mit authentischem β-Sitosterin nicht auftrat: die Chloroformphase färbte sich rot, die untere Schwefelsäureschicht nahm eine grünlich-gelbe Färbung an. Dieses Phänomen gab uns einen weiteren Hinweis auf die Uneinheitlichkeit unseres Aglykons.

Sitosterin ist wohl das am meisten vorkommende Sterin im Pflanzenreich, in der Verbreitung etwa analog dem animalischen Cholesterin. Es läßt sich formalchemisch vom Stigmastan

(= Sitostan) ableiten, einem Grundkohlenwasserstoff mit 29 C-Atomen (A.Stoll und E. Jucka, 1955). Anderson und anderen Autoren (1924, 1926, 1927) gelang der Beweis, daß es sich um einen konfigurativ einheitlichen Sterinkomplex handelt, bestehend aus den drei ungesättigten Sterinalkoholen α-, β- und γ-Sitosterin und einem Dihydro-β-sitosterin. α- Sitosterin wiederum wurde später durch fraktionierte Kristallisation des Dinitrobenzoats in α_1-,α_2- und α_3-Sitosterin aufgetrennt.

3. Die Uneinheitlichkeit des von uns isolierten Sterolinaglykons vermochten wir mit Hilfe chromatographischer Untersuchungen zu beweisen.

Die Papierchromatographie der lipophilen Steroide ist bis heute ein ungelöstes Problem. Viele Autoren berichten über einzelne erfolgreiche Arbeiten mit geeigneten Lösungsmittelsystemen,die zwar für spezielle Fälle brauchbar, bei einer umfassenden Anwendung jedoch wenig geeignet sind.

Tunmann (1956), angeregt durch die papierchromatographischen Untersuchungen von F. Winteringham (1950) und H.P. Kaufmann (1954) mit höher siedenden Kohlenwasserstoffen als stationäre Phase, benutzte zur Auftrennung seines acetylierten Sterinkomplexes aus Potentilla anserina mit Paraffinum liquidum imprägnierte Papiere; zur Entwicklung verwendete er als mobile Phase Methanol, Äthanol, Essigsäure u.a. Lösungsmittel. Er erreichte sowohl bei auf- als auch absteigender Chromatographie eine recht gute Verteilung der einzelnen Komponenten.

In Anlehnung an diese Methode, konnten wir mit Paraffinum liquidum als stationäre und Äthanol als bewegliche Phase keine Auftrennung unseres acetylierten Sterinkomplexes erzielen. Nach dem Besprühen mit einem Trichloressigsäure-Chloramin-Reagens war nur ein Fleck (R_F = 0,38) sichtbar, der etwa dem als Testsubstanz mitgelaufenen authentischen β-Sitosterin entsprach. Auch beim Auftragen einer stark konzentrierten Lösung konnten die sicher nur in geringer Menge vorhandenen Begleitsterine trotz wiederholter Versuche nicht nachgewiesen werden.

Einen leichten und geradezu verblüffenden Erfolg brachte uns dagegen die Anwendung der von E. Stahl (1958) weiterentwickelten Dünnschichtchromatographie auf Siliciumdioxydplatten. Diese adsorptionschromatographische Methode hat sich bisher bei der Auftrennung lipophiler Naturstoffe oder schwach polarer Substanzen bestens bewährt. Ein großer Vorteil bedeutet dabei die sehr kurze Entwicklungszeit. Als stationäre Phase benutzt man etwa 250 µ dünne Kieselgel-G-Schichten, die in der Adsorptionsaktivität ungefähr dem Merckschen Aluminiumoxyd nach Brockmann entsprechen.

Nach mehreren Versuchen fanden wir als ideale Laufphase das Gemisch Cyclohexan - Essigester (80 : 50; v/v), das eine scharfe Trennung der vier enthaltenen Komponenten gewährleistet. Zur Kenntlichmachung der einzelnen Substanzen verwendeten wir eine gesättigte Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform. Die folgende Tabelle vermittelt einen Überblick über die einzelnen Komponenten unseres Sterolinaglykons:

T a b e l l e 3

Aglykonkomplex des Phytosterolins aus Fructus Cardui benedicti

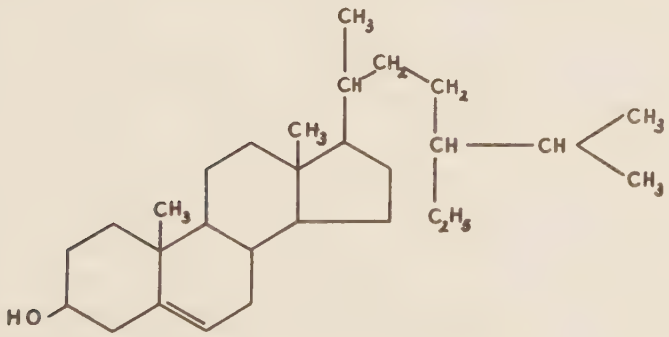
R_F-Wert	Färbung	
	UV-Licht	Tageslicht
0,18	orange	-
0,24	schwach orange	-
0,49	bläulich	-
0,54	rot-orange	violett

Quantitativ am stärksten trat auf dem Chromatogramm der Fleck mit dem R_F-Wert hervor, der dem als Vergleich mitgelaufenen ß-Sitosterin entsprach (R_F = 0,54); dieser Fleck war auch schon im Tageslicht gut sichtbar, während die anderen Komponenten, wohl aus quantitativen Gründen, nur im UV-Licht zu erkennen waren.

In einem weiteren Versuch prüften wir eine von H.Brockmann (1949, 1951) in neuerer Zeit entwickelte Methode, bei der farblose Substanzen an fluoreszierenden Adsorbentien chroma-

tographiert werden können. Aufgrund ihres optischen Absorptionsspektrums absorbiert die Substanzzone in bestimmten Wellenbereichen des Ultravioletts die auffallenden Lichtstrahlen und erscheint somit als dunkler Fleck auf dem fluoreszierenden Adsorbens. Wir verwendeten als Trägermasse eine mit Natriumfluoresceinlösung angerührte Kieselgelschicht. Während die β-Sitosterinkomponente gut erkennbar war, konnten die anderen drei Substanzen infolge ihrer geringen prozentualen Konzentration nicht ausgemacht werden.

Als Ergebnis der adsorptionschromatographischen Untersuchungen geht eindeutig hervor, daß der Hauptteil des Sterolinaglykons identisch ist mit β-Sitosterin.



β-Sitosterin

Mangels Vergleichssubstanzen vermögen wir über die Begleitsterine vorläufig keine Aussagen zu machen. Die geringe Ausbeute des von uns aus Kardobenediktenfrüchten isolierten Sterolins ließ eine präparative Trennung des Aglykons an einer Silikagelsäule nicht zu. Eine Übertragung der im Mikromaßstab erzielten Auftrennung auf "geschlossene" Silikagel-Säulen erscheint uns jedoch grundsätzlich möglich.

4. UV-Absorptionsspektrum.

Zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung von Steroiden wird oftmals die kolorimetrische und spektralphotometrische Auswertung der bei den entsprechenden Farbreaktionen entstehenden Reaktionsprodukte herangezogen. Diaz und Mitarbeiter (1952), Bernstein und Lenhard (1952) und andere Autoren benutzen zur Bestimmung von Steroiden die sich in konz. Schwefelsäure bildenden Chromogene, deren Extinktionskurven mit denen bekannter Substanzen einen guten Vergleich zulassen.

Als Voraussetzung für derartige Untersuchungen müssen selbstverständlich eine Anzahl von Bedingungen eingehalten werden. Von großem Einfluß auf die Chromogenbildung ist z.B. die Konzentration der Schwefelsäure; ebenfalls müssen bei Vergleichsuntersuchungen Temperatur- und Zeitdifferenzen vermieden werden. Das Steroid muß selbstverständlich rein sein.

Der Kurvenverlauf des β-Sitosterin-Chromogens zeigt ein breites Maximum zwischen 210 und 212 mμ und ein zweites Maximum bei 421 mμ. Das Chromogen unseres Sterolinaglykons besitzt die gleichen Maxima und Minima; die in geringer Menge vorhandenen Begleitsterine verursachen drei wenig ausgeprägte Schultern bei 220, 315 und 365 mμ.

Die vergleichende spektrographische Ausmessung des β-Sitosterin- und Sterolinaglykonacetats beweist ebenfalls die Uneinheitlichkeit unserer Verbindung: zusätzliche Maxima, hervorgerufen durch die Begleitsterine, sind eindeutig bei 273 mμ, 279 mμ, ein drittes kleineres Maximum bei 290 mμ zu erkennen.

III. Isolierung einer kristallinen Substanz aus der Ätherfraktion der Kardobenediktenfrüchte.

In dem öligen, aromatisch riechenden Rückstand der Ätherfraktion (F_2) konnten wir mikroskopisch kleine Kriställchen nachweisen, die sich durch einfache Umkristallisation nicht von dem begleitenden Öl entfernen ließen. Bei der chromatographischen Auftrennung des ätherischen Auszuges an Aluminiumoxyd vermochten wir aus einer Fraktion schwach gelblich gefärbte, rhombische Kristalle zu isolieren, die nach öfterem Umlösen aus organischen Lösungsmitteln farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 118 - 119°C ergaben.

Die Substanz war leicht löslich im Äther, Chloroform und heißem Alkohol, schwerlöslich in kaltem Alkohol und unlöslich in Wasser. Die Salkowski- und Liebermann- Burchardt- Reaktionen verliefen negativ, so daß es sich also nicht um ein Sterin handelt. Bei der Dünnschichtchromatographie stellte sich die Uneinheitlichkeit der Verbindung heraus. Im System Cyclohexanol-Essigester (80 : 50, v/v) gelang uns die Auftrennung in drei Substanzen, die nach Besprühen mit Antimontrichloridlösung verschiedene Farbtöne zeigten. (R_F-Werte und Farbreaktionen sind im Versuchsteil zusammengestellt).

Auf eine präparative Auftrennung des Substanzkomplexes und weitere qualitative Nachweise, die zur näheren Charakterisierung beigetragen hätten, mußten wir infolge der geringen Ausbeute verzichten.

IV. Phytochemisch - systematische Untersuchungen.

1. Vorbemerkungen.

Zwischen der Verbreitung eines sekundären Pflanzenstoffes im Pflanzenreich - ob ubiquitär, sporadisch oder taxonspezifisch -, der Evolutionstendenz chemischer Merkmale und dem Verlauf der Biosynthese scheinen gewisse Zusammenhänge zu bestehen, die K. Paech (1950) erstmals als "Häufigkeitsregel" darlegte. Je mehr Schritte in bestimmter Reihenfolge getan werden müssen, um einen sekundären Stoff hervorzubringen, um so weniger wahrscheinlich wird es, daß sich diese Kette in mehreren phylogenetisch getrennt entstandenen Arten in genau der gleichen Weise entwickelt hat. Eine Verbindung, deren Ahnenreihe vielgliedrig ist, wird sich also durch einmaliges Vorkommen auszeichnen. Auf der anderen Seite werden Stoffe, die sich nur durch einen oder wenige Schritte vom Ausgangsmaterial entfernt haben, mit großer Wahrscheinlichkeit in systematisch nicht näher verwandten Einheiten des Pflanzenreiches auftauchen.

Der vom Standpunkt der organischen Chemie aus komplizierte Pflanzenstoff ist nicht immer gleichzeitig der biologisch kompliziertere. Die Einzelglieder einer chemischen Entwicklungsreihe - geordnet nach steigenden Molekulargewichten entsprechend der immer weiter getriebenen Zusammenfügung einfacher Bausteine zu komplizierten Einheiten - zeigen keine sinkende Tendenz immer enger werdender Verbreitung im Pflanzenreich. Ein Beispiel dafür ist die Reihe, die von den monomeren Phenylpropankörpern über die dimeren Lignane zum polymeren Lignin führt.

C_9	C_{18}	$C_{\sim 500}$
Phenylpropankörper ⟶	Lignane ⟶	Lignine
(weit verbreitet)	(zerstreut vorkommend)	(in höheren Pflanzen ubiquitär)

Lignin selbst ist eine Sammelbezeichnung für chemisch unterschiedliche polymere Phenylpropankörper, in deren feinerer Ausgestaltung sich - wie noch im einzelnen dargelegt

wird - eine Art Evolutionstendenz von den methoxylarmen Ligninen der Pteridophyten und Gymnospermen zu den methoxylreichen der Angiospermen zeigt.

2. Chemie der Lignane und Lignine.

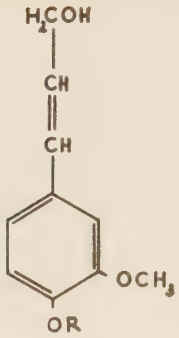
Die Lignane umfassen eine Gruppe von Naturstoffen, denen ein 2,3 - substituiertes 1,4 - Diphenylbutan - Gerüst zugrunde liegt. Formalchemisch läßt sich der Aufbau der dimeren Lignane aus einfachen Phenylpropankörpern nachweisen:

Lignangerüst

und dessen Aufbau aus

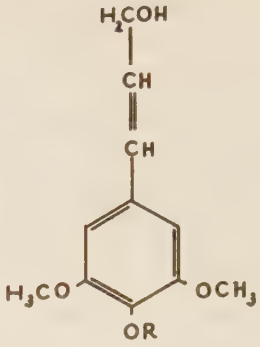
Phenylpropankörpern

Die polymeren Lignine lassen sich biosynthetisch ebenfalls auf einfache Phenylpropankörper zurückführen. Die wichtigsten Stammverbindungen dieser Inkrustationssubstanzen der pflanzlichen Zellmembran sind für das Nadelholzlignin Glucoside des Coniferylalkohols und für das Laubholzlignin Glucoside des Coniferylalkohols und des methoxylreicheren Syringenins:



R = Glucose = Coniferin

R = H = Coniferylalkohol



R = Glucose = Syringin

R = H = Syringenin (=Sinapinalkohol)

Die Glucoside werden in den Zellen, die in Verholzung begriffen sind, durch eine β-Glucosidase in Aglykon und Zucker gespalten. Die freigesetzten Aglyka, Coniferylalkohol und Sinapinalkohol, werden dann der Wirkung einer in dem gleichen Gewebe vorhandenen Dehydrase ausgesetzt. Dabei entstehen unter Wasserstoffentzug hochaktive radikalartige Moleküle, die sich zu ligninartigen Polymerisaten kondensieren. (Freudenberg, 1954).

3. Verbreitung der Lignane im Pflanzenreich.

Die Synthesefähigkeit von Lignanverbindungen ist keineswegs auf eine Anzahl untereinander nahe verwandter Pflanzen beschränkt. Wir finden sie teils als Aglyka, teils als Glykoside bei vielen Angio- und Gymnospermen. Bei einer Betrachtung der folgenden Übersicht über die Lignanvorkommen im Pflanzenreich fällt ihre systematisch weite, jedoch nur sporadische Verbreitung auf. Wie weit sind die auf der dimeren Kondensationsstufe liegen bleibenden Lignane taxonspezifisch? Bestimmte Vertreter kommen offensichtlich sporadisch verbreitet wor, z.B. das d-Sesamin (=Pseudocubebin), andere, wie das Cubebin, treten nur einmalig auf.

Eine taxonomische Auswertung des Lignanmerkmals drängt sich vor allem in den Klassen und Familien auf - als Beispiel etwa die Coniferae und die Piperaceae -, die ein gehäuftes Vorkommen an diesen Substanzen besitzen. Ehe man aber die bisher bekannten Lignane zur Deutung von Verwandtschaftsverhältnissen heranzieht, wären weitere systematische Untersuchungen auf das Vorkommen dieser Verbindungen nötig, denn wir glauben, daß diese sekundären Naturstoffe im Pflanzenreich häufiger anzutreffen sind, als man heute vermutet. Eine Schwierigkeit stellt dabei das Fehlen von spezifischen Nachweisreaktionen dar; dieses Problem müßte vorher gelöst werden.

Übersicht

I. Gymnospermae

Coniferae:

Taxaceae	Isotaxiresinol	Taxus baccata
Podocarpaceae	Matairesinol, Conidendrin	Podocarpus spicatus
Pinaceae	Lariciresinol	Larix decidua
	Pinoresinol	Pinus- u. Picea-Arten
	Conidendrin	Picea- u. Tsuga-Arten
Cupressaceae	Hinokinin	Chamaecyparis obtusa
	Savinin	Juniperus sabina
	Desoxypodophyllotoxin (Silicicolin)	Juniperus silicicola

II. Angiospermae

Dicotyledones

A Diapetalae

Polycarpicae:

Lauraceae	Pseudocubebin	Ocotea usambarensis
Berberidaceae	α-, β-Peltatin, Podophyllotoxin	Podophyllum peltatum
	Podophyllotoxin, Demethylpodophyllotoxin, Picropodophyllinglucosid	Podophyllum emodi

	Sikkimotoxin	Podophyllum sikkimensis
Himantandraceae	Galbacin, Galgravin	Himantandra baccata
Aristolochiaceae	(-) Sesamin	Asarum Sieboldii var. seoulensis
	Asarinin	Asarum Sieboldii und Asar.Siebold.var.seoul.
Hernandiaceae	Hernandion	Hernandia - Arten
Myrtales:		
Myrtaceae	Eudesmin	Eucalyptus - Arten
Gruinales:		
Zygophyllaceae	Guajaretsäure	Guajacum officinale
	Nordihydroguajaretsäure	Larrea - Arten
Terebinthales:		
Rutaceae	Xanthoxylin S = Asarinin	Xanthoxylum carolianum
	Fagarol	Xanthoxylum senegalense u. Fagara viridis
Umbelliflorae:		
Umbelliferae	Anthriscin	Anthriscus silvestris
	Cicutin	Cicuta maculata
B. Monochlamydeae		
Piperales:		
Piperaceae	Cubebin	Piper cubeba
	Pseudocubebin	Piper Lowong
	Aschantin +), Pseudocubebin	Piper guineense Schum.
C. Sympetalae		
Diospyrales:		
Symplocaceae	Symplocosin	Symplocos lucida
Contortae:		
Oleaceae	Olivil	Olea europaea
	Isoolivil	Olea Cunninghamia
	Phillyrin (Forsythin)	Forsythia- u. Phillyrea-Arten

+) Dissertation D. Zander, Berlin 1961

Tubiflorae:		
Verbenaceae	Gmelinol	Gmelina Leichtardtii
Personatae:		
Pedaliaceae	Sesamin	Sesamum indicum
Synandrae:		
Compositae	Arctiin	Arctium Lappa

4. Die Verbreitung des Arctiins bei den Cynareae.

Zu den Lignanen, von denen bisher nur ein einziges Vorkommen bekannt ist, gehört das Arctiin. Das Glykosid wurde von den Japanern J. Shinoda und M. Kawagoye (1929) aus den Früchten der großen Klette, Arctium Lappa L. isoliert. Lindner(1948) dehnt das Vorkommen von Arctiin, allerdings nur aufgrund unbewiesener Vermutungen, auf die Früchte von Arctium minus und Arctium tomentosum aus. Auch die Früchte der Saflorpflanze enthalten nach seinen Angaben einen Bitterstoff, der mit Arctiin identisch sein könnte. Sr.Patrick (1958) und J.A. Mockle und Sr. Patrick (1960) vermochten in den Früchten von Arctium minus, die im September geerntet worden waren, kein Arctiin nachzuweisen. Die Autoren betonen allerdings, daß das Glykosid in den Früchten nicht stabil ist und die Abwesenheit zeitlich - also ontogenetisch - bedingt sein könnte. Durch den Nachweis der Identität des von uns aus Kardobenediktenfrüchten isolierten Heterosids mit Arctiin erschien es nun interessant, einen größeren, zusammengehörigen Formenkreis auf die Anwesenheit dieses Bitterstoffes zu prüfen. Wir dehnten daher unsere Untersuchungen auf die Tribus der Cynareae aus, da einerseits die Gattung Arctium systematisch zu der Subtribus der Carduinae, die Gattung Cnicus benedictus zu der Subtribus der Centaureinae zu rechnen ist.

a) Im folgenden geben wir eine kurze botanische Übersicht über die untersuchten Gattungen. Wir stützen uns dabei auf das von O. Hoffmann im Engler-Prantl (1897) angegebene Ordnungssystem.

Tribus: Cynareae

Subtribus: Carduinae Centaureinae

Carduinae.

Arctium, Klette

Die Gattung umfaßt vier untereinander sehr nahe verwandte Arten, die von einigen Autoren nur als Abarten angesehen werden:
Arctium Lappa L., große Klette,
Arctium nemorosum Lej., Hainklette,
Arctium minus Schrank, kleinköpfige Klette und
Arctium tomentosum (Lam.) Schrank, filzige Klette.
Die Kletten sind in Europa und Asien weit verbreitet, nach Nordamerika eingeschleppt und dort eingebürgert.

Cousinia Cass.

Ein- oder zweijährige oder ausdauernde Kräuter. Etwa 210 Arten vor allem in Vorderasien.

Jurinea Cass, Bisamdistel.

Kräuter oder Halbsträucher mit etwa 50 Arten in Mittel- und Südeuropa, Nordwestafrika bis Mittelasien.

Carduus L., Distel.

Stachelige Kräuter von den Kanarischen Inseln über Nordafrika und Europa bis nach Japan verbreitet. Etwa 80 Arten mit zahlreichen Bastarden.

Cirsium Scop., Kratzdistel.

Kräuter oder Halbsträucher mit ca. 120 Arten und zahlreichen Bastarden in Europa, Nordafrika, dem gemäßigten Asien und Nordamerika.

Silybum, Mariendistel.

Dornige Kräuter mit zwei Arten: Silybum Marianum L. in Europa, Mittelmeergebiet bis Persien, in Nord- und Südamerika eingeschleppt. Silybum eburneum, vorwiegend in Spanien und Algerien.

Onopordon L., Eselsdistel.

Zweijährige, zum Teil stengellose Kräuter mit über 20 Arten in Europa, Nordafrika und Westasien.

Centaureinae.

Serratula L., Scharte.

Kräuter mit stacheligen Blättern; mit etwa 40 Arten über Europa, Nordafrika und das gemäßigte Asien bis Japan verbreitet.

Centaurea L., Flockenblume.

Kräuter oder seltener Halbsträucher. Mannigfaltige Gattung mit etwa 470 Arten besonders im Mittelmeergebiet, Europa, Asien, Nordafrika, Nord- und Südamerika und Australien.

Carthamus L., Saflor.

Distelartige, krautige Pflanzen mit ca. 20 Arten vorwiegend im Mittelmeergebiet.

Cnicus benedictus L., Kardobenedikte.

Distelartiges, einjähriges Kraut mit einer Art; europäisches Mittelmeergebiet und Kleinasien.

b) Untersuchungsmethode.

Wir konnten selbstverständlich immer nur einige Vertreter der zum Teil recht mannigfaltigen Gattungen für die Untersuchungen heranziehen. Infolge des geringen Drogenmaterials, das wir zur Verfügung hatten, waren wir auch nicht imstande, die uns interessierenden Substanzen zu isolieren. So galt es, für diese vergleichend phytochemisch-systematischen Untersuchungen eine Methode zu finden, die schnelle, spezifische und zuverlässige Ergebnisse erlaubt. Dies war nur mit Hilfe der papierchromatographischen Technik zu erreichen.

Wir entfetteten die Früchte mit Petroläther und extrahierten anschließend mit Methanol. Die meist dunkelbraun gefärbten Extrakte erwiesen sich infolge ihres hohen Gehaltes an harzartigen Ballaststoffen für eine direkte papierchromatographische Auftrennung als ungeeignet. Aus diesem Grunde reinigten wir die Auszüge, indem wir sie durch eine schmale Aluminiumoxydschicht filtrierten. Die nunmehr vorgereinigten Extrakte ließen sich im zweidimensionalen Verfahren recht gut in die einzelnen Komponenten auftrennen. Die uns interessierenden Substanzen waren vor der Purin-Lampe+)

+) Klein-UV-Analysenlampe PULA (Emissionsmaximum bei 260 mμ)

als dunkle Flecken sichtbar.

Wir eluierten die Substanzen aus den ausgeschnittenen Papierzonen mit Methanol und engten die Lösungen auf ein kleines, bestimmtes Volumen ein, um annähernd quantitative Verhältnisse zu schaffen. Die aus mehreren Chromatogrammen auf diese Weise gewonnenen Substanzlösungen chromatographierten wir erneut in zwei verschiedenen Lösungsmittelsystemen; als Testsubstanz ließen wir authentisches Arctiin mitlaufen. Der Vergleich der R_F-Werte der unbekannten Inhaltsstoffe mit dem der authentischen Substanz erschien uns sicherer, da eine exakte Reproduzierbarkeit der R_F-Werte von vielen äußeren Einflüssen abhängig ist.

Einen weiteren vergleichenden Hinweis auf Identität der einzelnen Substanzen erhielten wir durch die Farbreaktionen mit konz. Schwefelsäure bzw. Antimontrichlorid.

Die papierchromatographisch ermittelten Ergebnisse vermochten wir in den meisten Fällen durch direkten Vergleich der UV-Absorptionskurven zu bestätigen. Die aus den zweidimensional entwickelten Chromatogrammen eluierten Substanzen wiesen allerdings noch nicht den für eine spektrographische Aufnahme nötigen Reinheitsgrad auf; wir mußten aus diesem Grunde die Substanzen ein weiteres Mal chromatographieren und eluieren. Trotz dieser relativ langwierigen Methode konnten wir die Identität der eliminierten Substanzen mit Arctiin durch das UV-Absorptionsspektrum bekräftigen.

c) Ergebnisse:

Zusammenfassend war für uns die Identität mit dem Lignankörper Arctiin immer dann gegeben, wenn

1. die eluierte Substanz in beiden Lösungsmittelsystemen die gleichen R_F-Werte aufwies wie die mitlaufende authentische Testsubstanz.

Lösungsmittelsystem I	Lösungsmittelsystem II
n-Butanol-Eisessig-Wasser	Eisessig-Wasser
4 : 1 : 5, v/v/v.	15 : 85, v/v
R_F = 0,62	R_F = 0,84

2. wenn die Substanzen die gleichen Farbreaktionen (rotviolett) gaben und wenn

3. die UV-Absorptionskurven in der Lage der Maxima übereinstimmten. Eine geringe Verschiebung der Lage der Banden bei einigen Vertretern der Centaureinae erklären wir durch hartnäckig anhaftende Verunreinigungen, die sich auch durch mehrmalige Chromatographie nicht entfernen ließen.

Die beiden folgenden Tabellen geben eine orientierende Übersicht über die von uns untersuchten Vertreter der einzelnen Subtriben und Gattungen und die erzielten Ergebnisse:

Tabelle 4: Carduinae

		Arctiin	Arctigenin	UV-Maxima (mμ)
I	1) Arctium Lappa	++	+	230 ; 280
	2) Arctium minus	++	+	230 ; 280
	3) Arctium tomentosum	++	+	230 ; 280
II	Cousinia hystrix	+	-	230 ; 280
III	Jurinea alata	+	-	230 ; 280
IV	1) Carduus nutans	-	-	-
	2) Carduus personatus	-	-	-
	3) Carduus cernuus	-	-	-
V	1) Cirsium acaule	-	-	-
	2) Cirsium vulgare	(+)	-	-
	3) Cirsium canum	+	-	229 ; 283
VI	1) Silybum marianum	-	-	-
	2) Silybum eburneum	-	-	-
VII	1) Onopordon acaule	+	+	229 ; 279
	2) Onopordon acanthium	+	+	229 ; 279

Tabelle 5: Centaureinae

		Arctiin	Arctigenin	UV-Maxima (mμ)+)
I	1) Serratula radiata	+	-	221 ; 274
	2) Serratula quinquefolia	++	-	221 ; 275
II	1) Centaurea cyanus	+	-	-
	2) Centaurea cynaroides	+	-	221 ; 275
	3) Centaurea calcitrapa	+	-	225 ; 275
	4) Centaurea bella	+	-	-
III	1) Carthamus tinctoria	-	-	-
	2) Carthamus tinct.f. inerm.	-	-	-
IV	Cnicus benedictus	++	-	230 ; 280

Zeichenerklärung:
- \- kein Arctiin
- (+) geringes Vorkommen
- \+ positives Vorkommen
- ++ quantitativ hohes Vorkommen

d) Diskussion der Ergebnisse.

Geprüft wurden auf das Vorkommen von Arctiin in den Früchten 11 Gattungen der Tribus der Cynareae mit insgesamt 24 Artvertretern.

Die vorliegenden Ergebnisse unserer vergleichenden Untersuchungen zeigen, daß sich die einzelnen Gattungen der Tribus in ihrer chemischen Synthesefähigkeit unterscheiden. Bisher galt das Vorkommen von Arctiin als artspezifisch für Arctium Lappa L. - nach weniger zuverlässigen Angaben (M.W.Lindner, 1948) möglicherweise als gattungsspezifisch für die Gattung Arctium. Wir weisen nunmehr nach, daß das Arctiin in beiden Subtriben der Cynareae weiter verbreitet ist als bisher vermutet wurde: es tritt bei den Carduinae in den Gattungen Arctium, Cousinia, Jurinea, Cirsium und Onopordon und bei den Centaureinae in den Gattungen Serratula, Centaurea und Cnicus auf.

Eine Regelmäßigkeit hinsichtlich der Verbreitung des Lignanglykosids in den zwei Subtriben läßt sich bisher nicht

erkennen. Soweit unsere Untersuchungen Verallgemeinerungen erlauben, scheint die Arctiinführung innerhalb der genannten Gattungen ein durchgängiges Merkmal zu sein. Gelegentliches Fehlen - wie bei Cirsium acaule - würden wir als abgeleitet betrachten.

Interessant wäre jetzt eine vergleichende Untersuchung der Früchte der Cynareae auf Flavonoidvorkommen, nachdem es B. Janiak (1960) gelungen ist, aus Fructus Cardui Mariae zwei flavonoide Verbindungen zu isolieren. Der systematische Vergleich der beiden sekundären Naturstoffgruppen, die sich biochemisch in gleicher Weise auf einfache Phenylpropankörper zurückführen lassen, erscheint uns bemerkenswert. Vielleicht schließt die Bildung der einen Naturstoffgruppe den Aufbau der anderen aus, so daß man gewissermaßen von einem vikariierenden Vorkommen sprechen könnte.

Diese Gedanken tauchten leider erst nach Abschluß unserer experimentellen Untersuchungen auf. Durch die Vorreinigung der Extrakte an Aluminiumoxydsäulen wurden die eventuell vorhandenen polyphenolischen Flavonoide an der Säule adsorbiert und damit für weitere Untersuchungen nicht mehr brauchbar. Es wäre also zu begrüßen, wenn unsere experimentellen Unterlagen durch systematische Untersuchungen in der Flavonoidführung ergänzt werden könnten.

Wir durften nicht hoffen, mit dem vorliegenden phytochemischen Beitrag die umstrittene systematische Stellung einiger Gattungen innerhalb der Tribus der Cynareae zu klären.

Während sich die Compositen als Familie aufgrund charakteristischer morphologischer und anatomischer Merkmale leicht von anderen Familien abgrenzen lassen, und eine Unterteilung in zwei natürliche Unterfamilien ebenfalls gut möglich ist, ergeben sich bei der weiteren Gliederung der mannigfaltigen Arten und Formen dieser verhältnismäßig jungen, noch in voller Entwicklung begriffenen, Familie größte Schwierigkeiten. R. Leonhardt (1949) und A. Cronquist (1956) und andere Botaniker diskutieren in ihren Arbeiten die taxonomische Stellung der einzelnen Gattungen anhand von morphologischen Merkmalen und halten eine Änderung der systematischen Gliederung gerade innerhalb der beiden Subtriben der Cynareae für notwendig, ohne sich aber in ihren Grundvorstellungen einig zu sein.

Bei einer kritischen Betrachtung unserer Ergebnisse glauben wir, daß das Arctiinmerkmal nach Aufklärung der biosynthetischen Zusammenhänge als taxonspezifisches Element sicher zu verwerten ist.

Dies wäre eine weitere, schöne Bestätigung der engen Korrelationen zwischen Morphologie und physiologisch-chemischer Synthesefähigkeit der Pflanzen.

V. Zur Flavonoidführung in der Gattung Arctium.

1. Orientierende Untersuchungen.

Bei den einleitenden qualitativen Untersuchungen von Auszügen aus einzelnen Pflanzenteilen von Cnicus benedictus L. und Arctium-Arten konnten wir in Blättern von Arctium tomentosum papierchromatographisch und durch Reduktionsteste flavonoide Substanzen erkennen, während die Früchte und Wurzeln flavonoidfrei waren.

Es erschien uns im Rahmen unserer vergleichenden phytochemisch-systematischen Untersuchungen sinnvoll, das flavonoide Prinzip aus den Blättern zu isolieren, zumal die Angaben über die Inhaltsstoffe unklar sind. O. Geßner (1953) nennt etwa 0,03 % ätherisches Öl, daneben Gerbstoff und Schleim. Die neuerdings ermittelte choleretische Wirkung (E. Chabrol und Mitarbeiter, 1931) der Blätter könnte nach dem gleichen Autor dem ätherischen Öl oder einem Glykosid zukommen, wobei wohl das Arctiin gemeint ist. Nach unseren Untersuchungen enthalten die Blätter diesen Bitterstoff nicht. Wir nehmen an, daß die choleretische Wirkung der Blätter eher auf den Gehalt an flavonoiden Substanzen zurückzuführen ist; eine genaue Aussage muß natürlich pharmakologischen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Vor der Isolierung der flavonoiden Substanz aus dem Methanolextrakt der Blätter wurde zweckmäßig eine papierchromatographische Auftrennung der einzelnen Inhaltsstoffe angestrebt. Die Papierchromatographie liefert dabei eine Vielzahl experimentell verwertbarer Angaben, die es ermöglichen, sich Kenntnis von der Konstitution und Struktur des unbekannten Naturstoffes - auch bei geringer Konzentration - zu verschaffen. Grundlegende Arbeiten auf dem Flavonoidgebiet sind von E.C. Bate - Smith und R.G. Westall, S.H. Wender und Mitarbeitern, G. Lindstedt, Oshima und Nakabayashi und T.A.Geissman geleistet worden.

Wenn auch die bei den Voruntersuchungen angewandte eindimensionale Chromatographietechnik in dem System n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5, v/v/v) für einen qualitativen Nachweis der flavonoiden Substanz genügte, konnte uns diese einfache Arbeitsmethodik für die weitere Differenzierung

nicht befriedigen, da die Auftrennung der einzelnen Inhaltsstoffe mit scharf voneinander abgegrenzten R_F-Werten nicht gelang.

Das Flavonoid war von zwei im UV-Licht intensiv blau fluoreszierenden Substanzen, die quantitativ stark überwogen, begleitet und zum Teil überlagert, so daß wir durch Auswahl anderer Lösungsmittelgemische eine saubere Auftrennung zu erreichen trachteten. Versuche mit den Systemen Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10 : 2 : 3, v/v/v) und Eisessig-Wasser in variierenden Konzentrationen zeitigten ebenfalls keine befriedigenden Trenneffekte.

Zu recht guten Ergebnissen verhalf uns dagegen die zweidimensionale Papierchromatographie, die wir schon bei unseren phytochemisch-systematischen Vergleichsuntersuchungen mit Erfolg angewendet hatten. Als mobiles Laufmittel dienten in der ersten Dimension die organische Phase des dimeren Gemisches n-Butanol-Eisessig-Wasser und in der zweiten Richtung 15 %ige Essigsäure bei aufsteigender Entwicklung. Das folgende Chromatogramm-Schema gibt einen Überblick über die polyphenolischen Inhaltsstoffe des Methanolextraktes im R_F-Bereich von 0,3 bis 0,7. Die anderen Substanzen wurden der besseren Übersicht wegen nicht eingezeichnet.

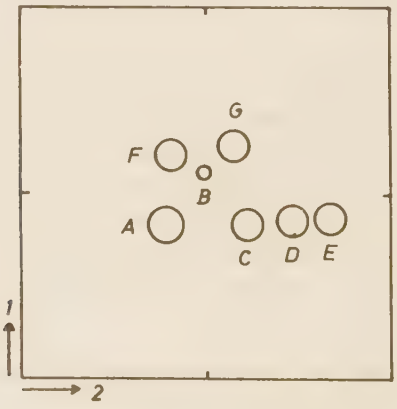


Abb. 1
Zweidimensionales Chromatogramm des Methanolextraktes aus Blättern von Arctium tomentosum L.

Die getrennten Substanzen konnten nunmehr aufgrund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften näher charakterisiert werden. Dazu wurden die Flecken im UV-Licht markiert, und anschließend eine weitere Identifizierung durch Besprühen mit verschiedenen Reagenzien versucht.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6

R_F-Werte und Farbreaktionen der polyphenolischen Inhaltsstoffe im R_F-Bereich von 0,3 bis 0,7.

Subst.	BEW	EW	unbehandelt		NH_3		alkohol. $AlCl_3$		bas. Bleiazetat		diazot. Sulfanilsäure		Bromphenolblau
	R_F	R_F	TL	UV	TL	UV	TL	UV	TL	UV	TL	UV	
A	0,45	0,43	sG	dB	G	GB	G	G	G	O	RO	R	-
B	0,59	0,50	-	dB	sG	GB	G	G	G	G	-	-	-
C	0,45	0,59	-	Bl	-	Gr	-	GGR	-	sG	-	RB	+
D	0,47	0,70	-	Bl	-	Gr	-	GGr	-	sG	-	RB	++
E	0,48	0,76	-	sGr	-	sGr	-	GGr	-	sG	-	RB	+
F	0,62	0,41	-	Bl	-	Gr	-	GGr	-	sG	-	RB	+
G	0,64	0,56	-	Bl	-	Bl	-	GGr	-	sG	-	OB	+

Zeichenerklärung:

BEW = n- Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5, v/v/v)
EW = Eisessig - Wasser (15 : 85, v/v)

G = gelb Gr = grün Bl = blau B = braun
R = rot O = orange
s = schwach d = dunkel + = positive Reaktion

Im UV-Licht geben sich die Flavonoide bis auf die Flavanone und die nahe verwandten Catechine auf dem Papier durch eine typisch gelbe bis braune Eigenfarbe oder durch Fluoreszenz zu erkennen. Flavonolaglyka z.B. fluoreszieren leuchtend gelb, während Flavonol-3-glykoside das UV-Licht absorbieren und im Chromatogramm als dunkle Flecken erscheinen.

Nach der Behandlung des Chromatogramms mit Ammoniakdämpfen trat eine reversible Bathochromie der dunkelbraunen Flecken

(A und B) in ein kräftiges Gelbbraun ein. Der Nachweis flavonoider Substanzen mit Aluminiumchlorid beruht auf Ausbildung eines tiefgelb gefärbten Metallkomplexes unter Aufbau einer Chelatstruktur; auch mit Bleisalzen entsteht ein intensiv gelb gefärbter Lack. Das Vorhandensein freier phenolischer Gruppen beweist die positive Kupplungsreaktion mit diazotierter Sulfanilsäure.

Nach diesen charakteristischen Reaktionen bestand für uns kein Zweifel, daß der Stoff A und die in geringer Konzentration vorliegende Substanz B flavonoider Natur waren.

Die Substanzen C bis G zeigten sowohl phenolischen als auch sauren Charakter und werden daher den zyklischen Pflanzensäuren zugeordnet; wahrscheinlich handelt es sich um Chlorogen- und Kaffeesäure. Eine endgültige Aussage allerdings wollen wir aufgrund der R_F-Werte und Farbreaktionen nicht treffen.

T.A.Geissman (1952) und H. Reznik (1956) sehen in den zyklischen Pflanzensäuren Zwischenprodukte bei der Biosynthese der Oxyphenylpropankörper - also auch den Flavonoiden -, so daß uns aus diesen Erwägungen heraus der Nachweis interessant erschien.

Die in der ersten Dimension im System n-Butanol-Eisessig-Wasser langgestreckten blau fluoreszierenden Flecken zeigten bei der Entwicklung mit 15 %iger Essigsäure eine nicht erwartete Auftrennung in drei (Substanz C, D und E) bzw. zwei Flecken (Substanz F und G) mit klar voneinander abgegrenzten R_F-Werten. Wir vermuteten hier eine Aufspaltung der Oxyzimtsäurederivate durch Säureeinfluß in ihre cis- und trans-Isomeren, eine Erscheinung, die erstmals von A.H.Williams (1955) und R.H. Cartwright und Mitarbeitern (1955) beobachtet wurde. Auch W. Pilarczyk (1958) berichtet bei der phytochemischen Untersuchung der Aristolochia Clematitis L.über dieses interessante Phänomen. Angeregt durch die optischen Untersuchungen an Cumarinen von Böhme und Severin (1957), die nach Aufspaltung der Laktonringe und der sich anschließenden cis-trans-Umlagerung eine charakteristische spektrale Veränderung der einzelnen Komponenten bewiesen, gelang es Pilarczyk durch Auftrennung der Oxyzimtsäuren in 15 %iger Essigsäure die von

Williams geäußerte Hypothese zu bestätigen. Er eluierte die eigenartigen Zwillingsflecken und stellte bei der spektralphotometrischen Ausmessung im Ultraviolett Verschiebungen der langwelligen Maxima fest: die trans-Form absorbiert dabei stets langwelliger und mit größerer Intensität.

Selbstverständlich versuchten wir durch papierchromatographische Vergleiche mit flavonoiden Testsubstanzen Hinweise auf eine eventuelle Identität zu gewinnen. Dies gelingt jedoch sicher nur mit Reinsubstanzen, so daß wir die Isolierung und Reindarstellung in Angriff nahmen, um anschließend durch weitere chemische Reaktionen die Identifizierung und Struktur der flavonoiden Substanzen zu sichern.

2. Isolierung einer flavonoiden Verbindung aus Blättern von Arctium tomentosum.

Die Isolierung der flavonoiden Verbindung erfolgte nach den üblichen klassischen Methoden der Flavonanalyse (Geissmann, 1955; R. Hänsel, 1959) durch Extraktion des Pflanzenmaterials mit Alkohol und anschließender fraktionierter Ausschüttelung mit organischen Lösungsmitteln.

Die getrockneten und zerkleinerten Blätter wurden im Soxhlet zur Entfernung lipophiler Bestandteile mit Petroläther behandelt und anschließend erschöpfend mit Methanol extrahiert. Der alkoholische Auszug wurde im Vakuum eingeengt, der sirupöse Rückstand mit heißem Wasser digeriert, und die amorphen Ballaststoffe durch Filtration entfernt. Die nunmehr klare, wäßrige Lösung schüttelten wir zur weiteren Reinigung mit Äther und Chloroform und dann so lange mit Essigester aus, bis die organische Phase nahezu farblos war. Die vereinigten Essigesterfraktionen wurden vorsichtig bis zur Trockne eingeengt, und der resultierende Rückstand in verdünntem Methanol aufgenommen. Nach längerer Aufbewahrung im Kühlschrank setzte auch nach Variation der Lösungsmittel keine Kristallisation ein. Eine fraktionierte Fällung der Flavonoide mit mehreren organischen Lösungsmitteln führte ebenfalls nicht zu einheitlichen Reinprodukten.

Eine papierchromatographische Prüfung des Rückstandes im System n-Butanol-Eisessig-Wasser zeigte, daß die flavonoiden Substanzen von Verunreinigungen begleitet waren, die zunächst eine saubere Kristallisation verhinderten.

Aus diesem Grunde versuchten wir eine weitere Reinigung durch ein säulenchromatographisches Verfahren zu erreichen.

Säulenchromatographie an Magnesol.

Die Adsorptionschromatographie wurde bei den flavonoiden Verbindungen nur selten angewendet, da man nur dann zu kristallinen Reinprodukten gelangt, wenn sie quantitativ ausreichend in den zu trennenden Substanzgemischen vorliegen.

Nach neueren Arbeiten von Pearl und Dickey (1951, 1952) und Ice und Wender (1952) eignet sich für die adsorptionschromatographische Auftrennung polyphenolischer Substanzen Magnesol, eine synthetische Verbindung von Magnesiumoxyd und Siliciumdioxyd (Magnesiumtrisilikat).

Wir engten die alkoholische Lösung des Rückstandes der Essigesterfraktion wiederum zur Trockne ein, lösten das schmierig-harzige Rohkristallisat in wasserfreiem Aceton und ließen die Lösung auf die Magnesolsäule auftropfen. Das Substanzgemisch wurde in einer Breite von etwa 2 cm am oberen Teil der Säule adsorbiert. Die Elution erfolgte unter schwachem Sog mit wassergesättigtem Aceton als mobile Laufphase. Im UV-Licht konnten wir nach einigen Stunden die Auftrennung in fünf Zonen erkennen.

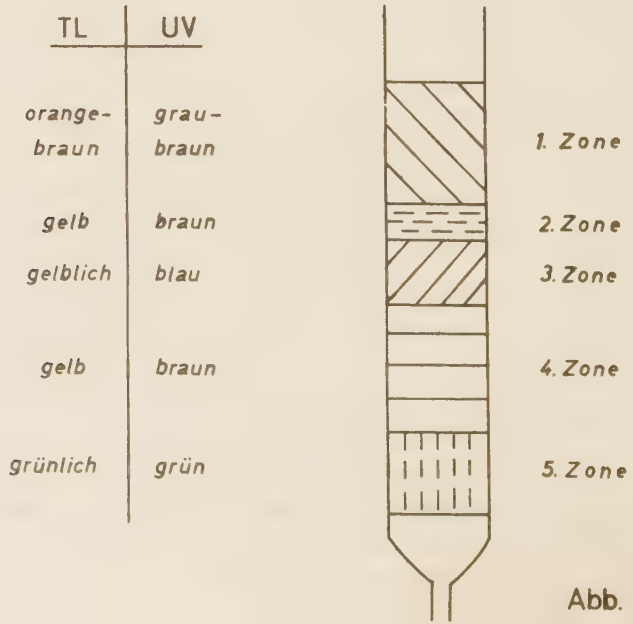


Abb. 2

Die schematisierte Abbildung gibt einen Überblick über die Lage und Farbe der einzelnen Zonen nach etwa 10stündiger Entwicklung. Die schnellwandernde Zone 5 bestand aus einer Verunreinigung und trennte sich später scharf von dem nachfolgenden Hauptflavonoid A (Zone 4), das als einheitliche Verbindung aufgefangen werden konnte. Die zunächst genügend voneinander abgegrenzten Zonen 2 und 3 liefen bei der weiteren Entwicklung ineinander über, so daß es nicht gelang, das Nebenflavonoid (Substanz B) in reiner Form zu gewinnen. Bei dem geringen Ausgangsmaterial bestand keine Hoffnung, die Verbindung bei einer nochmaligen Säulenchromatographie kristallin zu erhalten. Die Isolierung und Identifizierung wurde aus diesem Grunde aufgegeben, zumal kein Pflanzenmaterial mehr zur Verfügung stand. Die Zone 1 blieb im oberen Teil der Säule fixiert und war, da es sich lediglich um eine Verunreinigung handelte, für uns ohne Interesse.

Das Hauptflavonoid A wurde mehrmals aus verdünntem Äthanol umkristallisiert und schmolz bei 225 - 227° C unter Zersetzung. Die geringe Ausbeute von nur 2,5 mg des Hauptflavonoids konnte uns für die notwendigen Untersuchungen zur chemischen Identifizierung nicht befriedigen.

Da uns zur Gewinnung einer größeren Substanzmenge kein Frischpflanzenmaterial zur Verfügung stand, mußten wir, um den Fortgang der Untersuchungen zu sichern, auf Handelsware zurückgreifen. Während es keine Schwierigkeiten machte, die vorher bearbeitete Filzklette, Arctium tomentosum, systematisch genau festzulegen, war uns jetzt bei der gelieferten Handelsdroge eine exakte Herkunftsbestimmung nicht möglich. Nach der einschlägigen Fachliteratur stammen die Herba Bardanae, auch Herba Lappae genannt, von allen einheimischen Arctium-Arten. Wir waren also nicht in der Lage festzustellen, ob die Droge von einer einheitlichen Art stammt, oder ob eine Mischung mehrerer Arten vorliegt, abgesehen von Herkunft und zeitlichen Entwicklungsstadien der einzelnen Pflanzen.

Bei der vergleichenden papierchromatographischen Kontrolle eines Methanolauszuges kamen wir zu einem überraschenden Ergebnis. Das Hauptflavonoid war in etwa gleicher Konzentration enthalten, während das Nebenflavonoid nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Feststellung gewann später noch mehr

an Interesse, als wir einer Arbeit von Kirmayer (1959) entnehmen konnten, daß die von ihm getesteten Blätter von Arctium minus vollkommen flavonoidfrei waren. Schließlich sei noch erwähnt, daß wir nach einer erneuten Lieferung von Herba Bardanae der gleichen Firma überhaupt keine Flavonoide nachweisen konnten. Nach diesen für uns interessanten Ergebnissen drängt sich jetzt die Frage auf, ob das Vorkommen oder Fehlen der flavonoiden Substanzen artspezifisch gedeutet werden muß, oder ob es durch eine ontogenetisch bedingte Variabilität erklärt werden kann. Wir neigen eher zu der ersten Auffassung, da bei der weiten Verbreitung der Kletten eine Aufspaltung der Arten in mehrere Varietäten zu erwarten ist. Mit der Änderung morphologischer Merkmale kann selbstverständlich auch eine chemische Variabilität der Inhaltsstoffe einhergehen. Andererseits ist bekannt, daß Arten, die sich phänotypisch völlig gleichen, in ihrer chemischen Synthesefähigkeit nicht konstant erscheinen; damit wäre der Begriff der chemischen Rassen gegeben.

3. Isolierung des Flavonoids aus Herba Bardanae.

Die Isolierung der flavonoiden Substanz führten wir nach der bereits bekannten Methode durch Extraktion mit Methanol und Ausschütteln der wäßrigen Phase mit Äthylazetat durch. Da die das Flavonoid anhaftenden Begleitstoffe sich durch Umkristallisieren ohne größeren Substanzverlust nicht entfernen ließen, entschlossen wir uns, zur Reindarstellung der Substanz wiederum ein chromatographisches Verfahren anzuwenden.

Säulenchromatographie an Polyamid.

Die Verwendung von Polyamidpulver zur Auftrennung von flavonoiden Gemischen wurde erstmals von L. Hörhammer, H. Wagner und W. Leeb (1955) beschrieben. R.Neu (1958) erreichte mit Polyamid als Adsorbens eine Abscheidung der Flavone von Chalkonverbindungen. Hänsel, Pinkewitz, Langhammer und Heise isolierten das gelbe Pigment der Flores Stoechados, ein Chalkonglykosid, in einfacher Weise mit Hilfe einer Polyamidsäule.

Nach diesen erfolgreichen Arbeiten versuchten wir, nachdem wir bei der Reindarstellung des Arctiins genügend Erfahrungen gesammelt hatten, ebenfalls Polyamid als Adsorbens anstelle des vorher benutzten Magnesols anzuwenden. Dies geschah vor allem in dem Bestreben, die zeitlich langwierige Chromatographie an Magnesolsäulen zu vermeiden.

Wir lösten den Rückstand der Essigesterfraktion in 50 %igem Methanol und gaben die Lösung auf die vorher präparierte Perlonsäule. Nachdem das Substanzgemisch im oberen Teil der Säule fixiert war, eluierten wir zur Auftrennung in die einzelnen Zonen vorerst mit Wasser und anschließend mit verdünntem Methanol in steigender Konzentration.

Zuerst wurde eine breite, im UV-Licht blau fluoreszierende Zone, aufgefangen, die nicht weiter untersucht wurde. Die folgende, im Tageslicht gelbe, im UV-Licht dunkelbraune, breite Zone enthielt stark angereichert das Flavonoid. Nach einer papierchromatographischen Prüfung, die neben dem Flavonoid eine hartnäckige, blau fluoreszierende Begleitsubstanz mit anscheinend gleicher Affinität zum Adsorbens anzeigte, wiederholten wir die Auftrennung des Flavonoidbandes an einer zweiten Polyamidsäule.

Diesmal eluierten wir nur mit Wasser, wobei wir zwar für die quantitative Eliminierung der flavonoiden Substanz einen längeren Zeitraum benötigten, jedoch jetzt das Flavonoid in hohem Reinheitsgrad gewinnen konnten.

Nach mehrmaliger Umkristallisation aus verdünntem Äthanol und heißem Wasser schmolzen die feinen, hellgelben Nadeln bei 226 - 227° C. Ein Mischschmelzpunkt mit der aus Blättern von Arctium tomentosum isolierten Verbindung ergab keine Depression.

4. Identifizierung der flavonoiden Substanz als Quercetin-3-glucosid.

a) Quantitative Hydrolyse:

Die R_F-Werte der flavonoiden Substanz, besonders in 15 %iger Essigsäure, und die Wasserlöslichkeit ließen ein Glykosid vermuten. Zum Beweis müssen die nach einer Hydrolyse des Heterosids

entstehenden Spaltprodukte, Aglykon und Zucker, nachgewiesen werden.

Eine Hydrolyse mit 0,2 n-Schwefelsäure zeigte, daß sich aus der Verbindung ein Zucker abspalten ließ. Aus der quantitativen Bestimmung des Aglykons, das wir in einer Ausbeute von 62,7 % erhielten, läßt sich errechnen, daß jeweils ein Mol Aglykon mit einem Mol Zucker verknüpft ist: die isolierte Verbindung ist also ein Monoglykosid.

α) Nachweis des Aglykons.

Das Aglykon, das wir aus der Hydrolyseflüssigkeit gewinnen konnten, bestand nach mehrmaliger Umkristallisation aus gelben Nadeln, die in einem Schmelzpunktintervall von 298 - 302° C unter Zersetzung schmolzen. Es war löslich in Methanol und Äthanol, unlöslich dagegen in Äther und Wasser. Der definierte Schmelzpunkt und die Löslichkeitsverhältnisse hatten eine Identität mit Quercetin vermuten lassen. Eine endgültige Bestätigung erfuhren wir durch einen Mischschmelzpunkt mit authentischem Quercetin, der keine Depression aufwies und durch Darstellung des Acetylproduktes. Die zarten farblosen Nädelchen schmolzen bei 189 - 190° C und zeigten im Mischschmelzpunkt mit analog hergestelltem Pentaacetylquercetin keine Erniedrigung.

β) Bestimmung der Zuckerkomponente des Quercetinglykosids.

Nachdem das Aglykon identifiziert werden konnte, interessierte uns die Natur des abgespaltenen Zuckers. Aufgrund des Schmelzpunktes des Glykosids vermuteten wir, daß das Aglykon mit Glucose oder evtl. Galactose verglykosidiert war. Zu diesem Zweck chromatographierten wir die neutralisierte Zuckerlösung mit den authentischen Vergleichszuckern. In beiden angewendeten Systemen (1. α - Picolin - Ammoniak - Wasser, 70 : 2 : 28; 2. n-Butanol - Pyridin - Wasser, 6 : 4 : 3) trennte sich der Hydrolysezucker von der mitlaufenden Galactose. Wir überzeugten uns zusätzlich durch Darstellung des Osazons als spezifisches Vergleichsderivat; es schmolz bei 207 - 208°C und ließ im Mischschmelzpunkt mit authentischem Glucoseosazon keine Depression erkennen.

Damit war die flavonoide Verbindung eindeutig als Quercetinmonoglucosid identifiziert.

b) Vergleichende Papierchromatographie des Glykosids und Aglykons.

Obwohl die Struktur der flavonoiden Verbindung nunmehr feststand, wollten wir unsere Ergebnisse zusätzlich durch vergleichende papierchromatographische Untersuchungen mit authentischen Substanzen stützen.

Das nach Spaltung des Glykosids erhaltene Aglykon trennte sich in keinem von drei angewendeten Lösungsmittelgemischen von mitlaufendem Quercetin; auch die Farbreaktionen mit Aluminiumchlorid bzw. basischem Bleiazetat zeigten die Bildung gleichgefärbter Metallkomplexe.

Zu den vergleichenden papierchromatographischen Untersuchungen des Flavonoglykosids wurden authentisches Quercetin-3-galactosid(= Hyperosid), das bis zur genauen Charakterisierung des Zuckers in Betracht gezogen werden mußte, und, da authentisches Isoquercitrin nicht zur Verfügung stand, Essigesterfraktionen aus Arctostaphylus uva-ursi und Equisetum arvense, herangezogen. Eine eindeutige Trennung der beiden Quercetinglykoside ist uns, trotz Anwendung mehrerer Lösungsmittelsysteme, leider nicht gelungen. Die R_F-Werte wiesen nur eine äußerst geringe Differenz auf, so daß wir aufgrund dieser Ergebnisse keine klare Aussage hätten machen können. Durch die einwandfreie Identifizierung des Zuckeranteils unseres Glykosids konnten wir auf Anwendung besserer Trennmethoden verzichten.

c) Nachweis der Stellung der D-Glucose.

Der Vollständigkeit halber wollen wir kurz die Untersuchungen diskutieren, die wir zur Charakterisierung unserer Verbindung als Quercetin-3-glucosid ausführten .

Bei der Reduktion von Polyoxy-Flavonen mit Magnesium bzw. Zink und Salzsäure entstehen tiefrote Flavyliumsalze (Anthocyan) nach J. Shinoda (1928) beruht diese Farbreaktion auf einer Seitenphenylsubstitution.

Wir führten die Reduktion nach einem von Hörhammer und Hänsel (1954) spezifizierten Verfahren durch, das nach den genannten Autoren typisch für Flavonole mit einer Glykosid- oder Esterbindung am Kohlenstoffatom 3 ist. Die Flavonolzone eines Papierchromatogramms wurde mit Salzsäure befeuchtet und darauf Zinkplättchen gepreßt: es erfolgte eine spontane Rotviolettfärbung.

Eine weitere Bestätigung über die glykosidische Bindung am Kohlenstoffatom 3 erhielten wir durch ein positives Ergebnis des Zirkon-Zitronensäure-Tests nach Hörhammer und Hänsel (1951). Dabei läßt sich eine Aussage über die Substitutionsstellung machen, da sich 3-Oxy- und 5-Oxyflavone unterschiedlich gegen Zirkonoxychlorid-Zitronensäure verhalten. 5-Oxyflavone sowie 5-Oxyflavone mit substituiertem Hydroxyl in 3-Stellung bilden nach Behandlung mit Zirkonoxychloridlösung intensiv gelbgefärbte, sechsgliedrige Metallchelate, die mit Zitronensäure spaltbar sind. Flavonole mit freier Hydroxylgruppe in 3-Stellung sind aufgrund ihrer stabileren fünfgliedrigen Chelatstruktur gegen Zitronensäure beständig.

Die von uns isolierte Substanz bildete mit Zirkonoxychlorid einen gelben Metallkomplex, der nach Besprühen mit Zitronensäurelösung zerstört wurde. Nach Behandlung des Chromatogramms mit Salzsäurenebeln trat durch Hydrolyse des Glykosids die gelbe Färbung wieder auf.

Das gleiche Ergebnis konnten wir durch die von Tauböck (1942) modifizierte Wilsonsche (1939) Borsäure-Reaktion erzielen. Der Test mit Boroxalsäure beruht nach Hörhammer und Strasser (1952) auf der Bildung eines halochromen Boroxalat-Flavonol-Komplexes.

Das Flavonolglucosid bildete beim Eindampfen mit aliquoten Teilen Bor- und Oxalsäure einen tiefgelb gefärbten Komplex, der in ätherischer Lösung die für Flavonole typische grüne Fluoreszenz am Tageslicht zeigte.

Die freie Hydroxylgruppe in 5-Stellung, die sich schon mit Hilfe des Zirkon-Zitronensäure-Tests nachweisen ließ, bestätigte die Farbreaktion mit Eisen-3-chloridlösung.

Briggs und Locker (1951) vermochten aufgrund von Reihenuntersuchungen mit Polyoxy-Flavonen definierte Angaben über diese Reaktion zu machen: 3-, 5- und 8- Oxyflavone bilden mit Eisen-3-chlorid grüne, rote oder braune Komplexe, während 6-, 7- oder 4- Oxyflavone nicht reagieren.

Die alkoholische Lösung unseres Flavonolglykosids färbte sich nach Hinzufügen einiger Tropfen Eisen-3-chloridlösung spontan grün, so daß die freie Hydroxylgruppe in 5-Stellung als gesichert gelten kann.

d) UV-Absorptionsspektrum.

Die flavonoiden Verbindungsklassen wie Flavone, Flavonole, Flavanone und Chalkone lassen sich durch ihre spezifischen Absorptionsmaxima im Ultraviolett eindeutig festlegen, gleichgültig, ob sie als Aglyka oder Glykoside vorliegen.

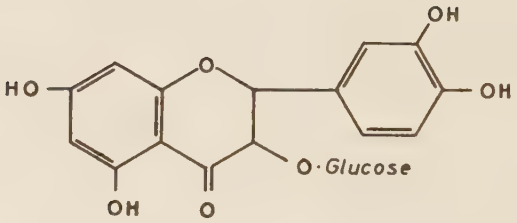
Während Flavone zwei ausgeprägte Banden in den Wellenbereichen um 250 mμ und 300 mμ besitzen, bedingt durch die Mesomerieverhältnisse des Benzpyronkerns (S.Aronoff, 1940), verschieben sich die Maxima der Oxyflavone nach längeren Wellenbereichen hin (240 - 260 mμ und 330 - 375 mμ). Dies beruht auf den Mehrgehalt an freien Hydroxylgruppen und damit auf Mehrausbildung chinoider Systeme.

Die von uns isolierte Verbindung zeigte den für Quercetin - 3 - monoglykoside typischen Extinktionsverlauf mit den beiden Maxima bei 257 mμ und 358 mμ. Die Hauptmaxima des Aglykons lagen bei 255 mμ und 371 mμ und stimmen mit den von Geissmann (1955) für Quercetin angegebenen Werten überein. Die hypsochrome Verschiebung des zweiten Maximums des Aglykons (Glykosid max_{II} 358 mμ; Aglykon max_{II} 371 mμ) um 13 mμ ist ein weiterer Beweis für die Verglykosidierung am Kohlenstoffatom 3.

e) Ergebnis:

Das von uns aus Blättern von Arctium tomentosum und aus Herba Bardanae isolierte Flavonoid A ist nach den vorliegenden Ergebnissen eindeutig als Isoquercitrin (Quercetin - 3 -

D - glucosid) identifiziert.



Isoquercitrin

(3,5,7,3',4'-Pentaoxyflavon-3-glucosid)

B. Zusammenfassung.

1. Aus den Früchten der mediterranen Cnicus benedictus L. wurde ein Glykosid mit dem Schmelzpunkt 118° C isoliert, das in seinen chemischen und physikalischen Daten dem Arctiin aus den Früchten von Arctium Lappa L. identisch ist.

2. Für vergleichende Untersuchungen wurde das Arctiin aus Fructus Bardanae mit Hilfe einer neuen, verbesserten Methode gewonnen. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung des Rohkristallisats an Polyamid konnte der bisher in der Literatur angegebene Schmelzpunkt von 112° C auf 118° C erhöht werden.

3. Das Arctiin besitzt gegen das grampositive Bakterium Staphylococcus aureus keine antibakterielle Wirksamkeit.

4. In den Kardobenediktenfrüchten wurde ein Phytosterolin mit dem Schmelzpunkt 297-300° C gefunden. Das Aglykon besteht aus einem Sterinkomplex, der dünnschichtchromatographisch in 4 Komponenten aufgetrennt werden konnte. Die Hauptkomponente ist mit β-Sitosterin identisch.

5. Aus der Ätherfraktion der Fructus Cardui benedicti wurde ein kristallines Substanzgemisch vom Schmelzpunkt 118-119° C isoliert. Infolge der geringen Ausbeute mußten wir auf eine präparative Trennung und Identifizierung der drei Bestandteile verzichten.

6. Bei unseren vergleichenden phytochemisch-systematischen Untersuchungen konnten wir in beiden Subtriben der Cynareae zahlreiche Neuvorkommen von Arctiin feststellen. Außer der Gattung Arctium enthalten folgende Gattungen dieses Lignanglykosid:
   Carduinae: Cousinia, Jurinea, Cirsium und Onopordon.
   Centaureinae: Serratula, Centaurea und Cnicus.

7. Die Brauchbarkeit des Arctiinmerkmals als systematisches Element wird diskutiert.

8. Aus Blättern von Arctium tomentosum (Lam.) und aus Herba Bardanae konnte ein Flavonol-3-glucosid isoliert werden, dessen Identität mit Isoquercitrin bewiesen wird.

C. Experimenteller Teil

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroskopheiztisch 350 der Fa. Leitz bestimmt. Die UV-Absorptionskurven wurden im Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss gemessen.

Orientierende Prüfung auf Vorkommen flavonoider Substanzen und Schwefelsäure-Chromogene in Cnicus benedictus und in Arctium Lappa.

Herkunft und Vorbereitung der Pflanzenextrakte.

Cnicus benedictus L.

Früchte : Handelsware der Fa. Bornträger
Kraut : Herb. Cardui benedict. DAB 6
Blüten : Botan. Garten Berlin-Dahlem

Arctium Lappa L.

Früchte : Handelsware der Fa. Bornträger
Kraut : Botan. Garten Berlin-Dahlem
Wurzeln : Rad. Bardan. Erg.-Bd. DAB 6

Etwa 5 g des entsprechenden getrockneten Pflanzenmaterials wurden in einen 50 ml Rundkolben mit aufgesetztem Rückflußkühler 30 Minuten auf dem Wasserbad mit je 25 ml Methanol extrahiert. Die filtrierten Extrakte wurden im Vakuum auf ein Volumen von 10 ml eingeengt und zwei Stunden im Eisschrank unterkühlt; dabei ausgefallene Ballaststoffe wurden abfiltriert.

Die in dieser Weise hergestellten Pflanzenextrakte wurden
1. papierchromatographisch und
2. in Reagenzglas-Versuchen

getestet.

1. Papierchromatographie.

Papier: Schleicher & Schüll 2043 bM
Lösungsmittelsystem : n-Butanol - Eisessig - Wasser (4 : 1 : 5; v/v/v; organische Phase)

Entwicklung der Chromatogramme:

Mit Hilfe einer Mikropipette wurden auf zwei Papierbögen - jeweils 6 cm vom unteren Rand entfernt, im Abstand von je

drei cm - 0,02 ml der einzelnen Pflanzenextrakte auf den Startpunkten angereichert und nach 5stündiger Sättigungszeit in einer zylindrischen Glaskammer aufsteigend chromatographiert; die Laufzeit betrug 5 Stunden.

Nachweisreaktionen:
Nach dem Trocknen wurde das eine Papierchromatogramm auf einer Glasplatte mit konz. Schwefelsäure behandelt, das zweite mit einer 1 %igen methanolischen Aluminiumchloridlösung besprüht. Die R_F-Werte und Farbreaktionen sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7

R_F-Werte und Farbreaktionen

	R_F-Wert	conc.H_2SO_4	R_F-Wert	$AlCl_3$i.CH_3OH
Cnicus bened.				
Früchte	0,62+)	rotviolett	-	-
Kraut	-	-	-	-
Blüten	-	-	-	-
Arctium lapp.				
Früchte	0,62	rotviolett	-	-
Kraut	-	-	0,44	gelb
Wurzeln	-	-	-	-

+) diese Substanz wird als Cnicussubstanz C bezeichnet

2. Reagenzglas-Versuche.

a) Jeweils 2 ml des Methanolextrakts wurden in einem Reagenzglas mit dem gleichen Volumen konz.Schwefelsäure unterschichtet, und die auftretende Farbtönung beobachtet. Bei positivem Ausgang der Reaktion färbte sich die Berührungszone der beiden Flüssigkeiten rotviolett; später dehnte sich die Färbung auf die gesamte untere Schwefelsäure-Phase aus.

b) Reduktionstest nach R.W.Willstätter.

In einem Reagenzglas wurden 2 ml des Extrakts mit etwas Magnesiumpulver versetzt und darauf tropfenweise konz. Salz-

säure zur Wasserstoffentwicklung hinzugefügt. Bei positivem Ausgang der Reaktion entstand eine tief karmesinrote Färbung.

c) Reduktions-Test nach A.E. Everest und J.C. Pew.

Zu 2 ml des Extrakts wurden etwas Zinkpulver und tropfenweise konz. Salzsäure unter Wasserkühlung zugegeben. Eine Farbentwicklung von Rosa über Rot nach Rotviolett deutete auf ein 3-Oxyflavon (=Flavonol) mit äther- oder esterartiger Bindung am C_3. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 angeführt.

Tabelle 8

Farbreaktionen

	conc. H_2SO_4	Mg + HCl	Zn + HCl
Cnicus bened. L.			
Früchte	+	-	-
Kraut	-	-	-
Blüten	-	-	-
Arctium lapp. L.			
Früchte	+	-	-
Kraut	-	+	+
Wurzeln	-	-	-

Isolierung der Cnicussubstanz C aus den Früchten von Cnicus benedictus L.

Als Ergebnis der papierchromatographischen Voruntersuchungen wurde folgende Isolierungsmethode ausgewählt:

1 kg feingemahlene Früchte (Handelsware der Firma Bornträger) wurde in mehreren Anteilen 24 Stunden im Extraktionsapparat nach Soxhlet zur Entfernung des fetten Öls und anderer lipoidlöslicher Bestandteile mit Petroläther (Fraktion F_1) behandelt und anschließend die gleiche Zeit mit 5 l Äther (Fraktion F_2) extrahiert. Zur Gewinnung der Cnicus-Substanz wurden die Früchte nun etwa 30 Stunden erschöpfend mit 5 l Methanol (Fraktion F_3) ausgezogen, der rotbraun gefärbte Extrakt nach dem Erkalten filtriert, und das Lösungsmittel nach Hinzufügen von 10 g Calciumcarbonat zur Neutralisation

etwa vorhandener Pflanzensäuren unter vermindertem Druck bei 60° abgezogen. Es hinterblieben etwa 25 g eines braunen harzigen Breis, in welchem das Glykosid enthalten war. Dieser Rückstand wurde nun in 5 Anteilen mit insgesamt einem l Wasser digeriert. Beim Erkalten setzte sich am Boden des Gefäßes eine kleine Menge einer braunen schmierigen Masse ab, die durch Abdekantieren und Filtration durch eine Mullschicht entfernt wurde. Zur weiteren Klärung wurde die trübe Lösung zentrifugiert und anschließend durch Destillation im Vakuum auf ein Volumen von 300 ml konzentriert. Der wäßrige Auszug wurde nun in einem Scheidetrichter 10mal mit je 100 ml Äthylacetat ausgeschüttelt, wodurch die Substanz quantitativ in das organische Lösungsmittel übergeführt wurde. Die vereinigten Fraktionen wurden unter vermindertem Druck auf ein Volumen von 300 ml eingeengt und durch Hinzufügen von wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Aus dieser gelbgefärbten Essigesterfraktion kristallisierte die Substanz nach mehrtägiger Unterkühlung im Eisschrank in Form von schmutzig-weißen Kristallaggregaten aus.

Die Ausbeute betrug 740 mg Rohkristallisat (d.s. 0,07 % bezogen auf die Ausgangsdroge).

Reinigung der Cnicussubstanz C.

1. durch Umkristallisieren.

Das Rohkristallisat wurde mit Hilfe einer Filternutsche abgesaugt und bei 60° C wiederum in Essigester gelöst. Nach zweitägigem Aufbewahren bei -2° C war die Substanz auskristallisiert. Sie wurde abgenutscht, zur weiteren Reinigung in heißem Methanol gelöst und der Lösung bis zur einsetzenden Trübung Wasser zugesetzt. Nach mehrtägigem Stehen bei Zimmertemperatur fiel die Substanz in Form von weißen Nadelaggregaten aus. Da sie sich papierchromatographisch noch nicht als einheitlich erwies (Verunreinigung blauer Fleck von R_F-Wert = 0,82), wurde eine andere Reinigungsmethode gewählt.

2. durch Chromatographie an einer Polyamid-Säule.

Etwa 50 g Perlonpulver (Versuchsprodukt PP 15 der Firma BASF) wurden in einem Mörser mit etwas Wasser zu einem homo-

genen Brei angerührt und nach Zugabe von 50 ml Wasser eine Stunde der Quellung überlassen. Danach wurde die Suspension in eine Glassäule von 35 cm Länge und drei cm Durchmesser, in die am unteren Ende eine Glasfritte eingeschmolzen war, in kleinen Anteilen eingeschlämmt. Durch Rühren mit einem Glasstab wurden die eingeschlossenen Luftblasen entfernt. Die obere Zone der Perlonsäule beschwerten wir vorsichtig mit einer etwa 2 cm hohen Seesandschicht, um beim Aufgießen des Elutionsmittels ein Aufrühren des Perlonpulvers zu vermeiden. Die so hergestellte Säule wuschen wir mit etwa 250 ml destilliertem Wasser, bis das Eluat klar abtropfte. Nun wurde das in wenig Methanol gelöste Rohkristallisat vorsichtig mit Hilfe eines kleinen Scheidetrichters auf die Säule getropft und anschließend mit etwa 250 ml Methanol (50%ig) eluiert. Bei einer Abtropfgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute war die Substanz in etwa 4 Stunden quantitativ aus der Säule eluiert. Nach Filtrieren und Einengen auf ein Volumen von 25 ml kristallisierte die Substanz in rein weißen Nadeln aus. Sie wurde auf einer Filternutsche abgesaugt und anschließend 12 Stunden bei 50° C im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet. Der Schmelzpunkt lag bei 118° C.

Identifizierung der Cnicussubstanz C.

1. Hydrolyse:

a) Säurehydrolyse:

100 mg Substanz wurden in wenig Methanol gelöst, die Lösung bis zur einsetzenden Trübung mit Wasser verdünnt, und dazu eine genau berechnete Menge Schwefelsäure gegeben, so daß eine 0,2 normale Lösung resultierte. Zur Hydrolyse wurde die Lösung am Rückflußkühler eine Stunde auf dem Wasserbad erhitzt; die Badtemperatur betrug 80°C. Das Aglykon, das nach dem Erkalten quantitativ ausgefallen war, wurde in einem Scheidetrichter durch 10maliges Ausschütteln mit Äther entfernt, die ätherische Lösung über geglühtem Natriumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel auf dem Wasserbad abdestilliert. Anschließend wurde das Aglykon auf eine Filternutsche gebracht, mit kaltem Wasser säurefrei gewaschen, je zweimal aus Chloroform und Methanol umkristallisiert, im Vakuum über Phosphorpentoxyd getrocknet und gewogen.

Ausbeute: 66,84 mg (d.s. 66,84 % Aglykon).

Der Schmelzpunkt des Aglykons lag bei 102° C.

b) Enzymatische Hydrolyse:

Die enzymatische Spaltung der Cnicussubstanz durch β-Glucosidase konnte durch folgenden Versuch nachgewiesen werden: 20 mg Substanz wurden bei 50° C in 25 ml Pufferlösung (0,1 n-Natriumacetat-Essigsäure-Puffer, p_H= 5,6 [potentiometrisch gemessen]) gelöst, mit einigen mg β-Glucosidase +) versetzt, und das Reaktionsgemisch bei 37° C im Brutschrank aufbewahrt. Die anfangs klare Lösung begann sich bereits nach einer Stunde zu trüben. Nach 24 Stunden wurde das fermentativ abgespaltene Aglykon durch 5maliges Ausschütteln mit je 20 ml Äther aus dem Puffergemisch entfernt, und die Lösung über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Nach Vertreiben des organischen Lösungsmittels wurde das Aglykon dreimal aus Methanol umkristallisiert. Nach dem Trocknen betrug der Schmelzpunkt 102°C.

Eine papierchromatographische Kontrolle bewies eine quantitative Spaltung.

Als Blindprobe wurde ein zweiter Ansatz ohne β-Glucosidase den gleichen Bedingungen unterworfen. Es trat keine Hydrolyse ein.

Papierchromatographie und Osazonbildung des Zuckeranteils:

Die nach dem hydrolytischen Abbau der Cnicussubstanz C resultierende schwefelsaure Zuckerlösung wurde durch vorsichtige Zugabe von Bariumkarbonat neutralisiert, und das abgeschiedene Bariumsulfat durch Zentrifugieren und Filtration entfernt. Von der im Vakuum auf 1 ml eingeengten Lösung wurde ein Teil zur papierchromatographischen Prüfung, ein anderer Teil zur Osazonbildung verwendet.

a) Papierchromatographie.

Aufgetragen wurden - im Wechsel und im Abstand von 4 cm - 0,1 ml der konzentrierten Zuckerlösung, eine 0,1 %ige Lösung authentischer D-Glucose und eine Mischung beider Lösungen.

+) β-Glucosidase, kristallin Chem. Fabrik Buchs SG

Papier : Schleicher & Schüll 2043 b M.
System : a) n-Butanol-Pyridin-Wasser (6 : 4 : 3, v/v/v),
b) n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5, v/v/v).

Die Sichtbarmachung der Flecken erfolgte durch Besprühen mit Anilinphthalatlösung nach Partridge (1,66 g o-Phthalsäure + 0,93 g Anilin in 100 ml wassergesättigtem n-Butanol) und Trocknen bei 105° C (10 Minuten).

Tabelle 9

	Lösungsmittelsystem	
	R_F(a)	R_F(b)
Zuckeranteil von		
Subst. C	0,36	0,21
D-Glucose	0,36	0,21

b) Osazonbildung:

0,5 ml der neutralisierten Zuckerlösung wurden mit dem gleichen Volumen einer Lösung von 2 g Phenylhydrazinhydrochlorid und 3 g wasserfreiem Natriumacetat in 20 ml Wasser versetzt und in einem kleinen Rundkölbchen eine Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt. Beim Erkalten fiel das Osazon als hellgelber kristalliner Niederschlag aus. Er wurde auf einer Mikronutsche gesammelt, mit wenig Wasser gewaschen und zweimal aus 70 %igem Äthanol umkristallisiert. Schmelzpunkt 208 - 209° C.

Im Mischschmelzpunkt mit authentischem Glucoseosazon trat keine Depression ein.

Spezifische Drehung.

Zur Bestimmung der optischen Aktivität wurde eine genau gewogene Menge der kristallwasserhaltigen Cnicussubstanz C in 100 ml Chloroform (p.a.Merck) gelöst und gemessen. Einwaage: c = 0,1003 g Cnicussubstanz C / 100 ml Chloroform. Gemittelter Wert aus 10 Einzelmessungen $\alpha = -0,39°$. Die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20°}$ einer gelösten Substanz errechnet sich nach der Formel:

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot l}$$

l = Schichtdicke Lösung (dm)
c = Konzentration in g/100 ml
α = abgelesener Winkel

Die Cnicussubstanz C war optisch aktiv und zeigte eine Linksdrehung von

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = - 38,8^\circ$$

Elementaranalyse. +)

Zur Analyse wurde das Glykosid 24 Stunden im Hochvakuum bei 50° C über Phosphorpentoxyd getrocknet. Aus diesen Werten errechnet sich die Summelformel $C_{27}H_{34}O_{11} \cdot H_2O$.

Ber.	C 58,69 %	H 6,57 %	O 34,75 %
Gef.	C 59,0 %	H 6,8 %	O 34,2 % +)

80,3 mg Cnicussubstanz C verloren beim Konstanttrocknen bei 80° C 2,8 mg Wasser = 3,84 %; dieser Wert entspricht einem Kristallwasserverlust von 1 Mol (3,24 %).

Isolierung von Arctiin aus Früchten von Arctium Lappa L. zu Vergleichszwecken.

Die Isolierung authentischen Arctiins aus Arctium Lappa erfolgte nach der auf Seite 64 beschriebenen Methode für Cnicussubstanz C.

1 kg feingemahlene Früchte (Handelsware der Firma Bornträger) wurden mit Petroläther entfettet, zur Vorreinigung mit Äther ausgezogen und anschließend erschöpfend mit Methanol extrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Rückstand in heißem Wasser aufgenommen, und die wäßrige Phase mit Essigester ausgeschüttelt.

Die Reinigung des Rohkristallisats erfolgte ebenfalls an einer Polyamidsäule (Versuchsprodukt PP 15 der Firma BASF).

Ausbeute 650 mg. (= 0,065 %)
Der Schmelzpunkt betrug nach Konstanttrocknung im Vakuumexsiccator 118° C. Der Mischschmelzpunkt mit Cnicussubstanz C ergab keine Depression.

+) Sauerstoff direkt bestimmt.

Säurehydrolyse des Arctiins.

Die Hydrolyse des Arctiins erfolgte ebenfalls durch 0,2 n-Schwefelsäure. Der Schmelzpunkt des Arctigenins betrug 102° C.

Im Mischschmelzpunkt mit dem Aglykon aus Cnicussubstanz C trat keine Depression auf.

Vergleichschromatographie der Cnicussubstanz C und des Aglykons bzw. Arctiin und Arctigenin.

Zur vergleichenden Chromatographie der isolierten bzw. hergestellten Substanzen kamen
a) die Papierchromatographie und
b) die Dünnschichtchromatographie nach E. Stahl
zur Anwendung.

a) Papierchromatographie

Papier	:	Schleicher & Schüll 2043 bM.
Lösungsmittelsysteme	:	1. n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5 (v) organische Phase)
		2. Eisessig-Wasser (15 : 85 v/v).
Gefäß	:	Zylindrische Glaskammer
Methode	:	

Cnicussubstanz C und Arctiin werden in Methanol, die Aglyka in Äther / Methanol (1 + 1) zu gleichen Konzentrationen gelöst, und die Lösungen 6 cm vom unteren Rand entfernt und im Abstand von 3 cm nach folgendem Schema aufgetragen:

1. Cnicussubstanz C und Arctiin im Wechsel,
2. eine gleichkonzentrierte Mischlösung beider Substanzen,
3. Subst. C-Aglykon und Arctigenin im Wechsel und
4. eine gleichkonzentrierte Mischung beider Substanzen.

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte aufsteigend.
Nachweis:
Die entwickelten Zonen, die unbehandelt infolge Fluoreszenzlöschung nur als dunkle Flecken unter kurzwelligem UV-Licht +) zu erkennen sind, wurden durch Besprühen mit einer gesättigten Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform und anschlie-

+) Klein-UV-Analysenlampe PULA

Sendem Erhitzen bei 90° C (10 Minuten im Trockenschrank) sichtbar gemacht.

Tabelle 10

	System		Reagens	
	1 R_F	2 R_F	Antimontrichl. i. Chlor.	diazot. Sulfanils.
Cnicussubst.C	0,62	0,84	rotviolett	-
Arctiin	0,62	0,84	rotviolett	-
Subst.C Aglyk.	0,86	-	rotviolett	rot
Arctigenin	0,86	-	rotviolett	rot

b) Dünnschichtchromatographie

Adsorbens : Kieselgel G (Merck) nach E. Stahl
Laufmittel : 1. Essigester - Methanol (95 : 5; v/v)
2. Cyclohexanol - Essigester (70 : 80; v/v)

Methodisches:

Die Herstellung der Trägerplatten erfolgte nach der von E. Stahl angegebenen Arbeitstechnik (E. Stahl, Arbeitsvorschrift für das DESAGA-Streichgerät).

Die Cnicussubstanz C und Arctiin bzw. Cnicussubstanz C-Aglykon und Arctigenin wurden zu gleichen Konzentrationen (0,01 g/10 ml) in Chloroform gelöst und im Wechsel und in Mischlösungen auf den Startpunkten aufgetragen.

Die Flecken wurden einmal durch Besprühen mit einer gesättigten Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform und 5minütiges Erhitzen bei 90° C im Trockenschrank und durch Behandeln mit konz. Schwefelsäure sichtbar gemacht.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11

	System		Reagens	
	1 R_F	2 R_F	Antimontrichl. i.Chlor.	konz. Schwefelsäure
Cnicussubst.C	0,23	-	rotviolett	rotviolett
Arctiin	0,23	-	rotviolett	rotviolett
Subst.C Aglyk.	0,77	0,64	rotviolett	rotviolett
Arctigenin	0,77	0,64	rotviolett	rotviolett

Quantitative UV-Spektren der Cnicussubstanz C und des Arctiins.

Beide Substanzen wurden 12 Stunden in einer Vakuum-Trockenpistole über Phosphorpentoxyd getrocknet. Die nunmehr wasserfreien Naturstoffe wurden zu bestimmten Konzentrationen in Methanol (p.a. Merck) gelöst und mit dem Spektralphotometer die Lichtabsorptionen in dem Wellenbereich von 210 - 290 mμ im Abstand von 5 mμ gemessen.

Die UV-Absorptionskurven der Substanzen C aus Cnicus benedictus und Arctiin aus Arctium lappa stimmten nach Lage und Höhe der Banden überein:

Cnicussubstanz C: Einwaage : 0,0056 g / 100 ml CH_3OH.

λ max $_{I}$ = 211 mμ ($\log\varepsilon_{mol}$ = 4,20)
λ max $_{II}$ = 230 mμ ($\log\varepsilon_{mol}$ = 4,18)
λ max $_{III}$ = 280 mμ ($\log\varepsilon_{mol}$ = 3,71)

Arctiin : Einwaage : 0,0054 g / 100 ml CH_3OH.

λ max $_{I}$ = 211 mμ ($\log\varepsilon_{mol}$ = 4,24)
λ max $_{II}$ = 230 mμ ($\log\varepsilon_{mol}$ = 4,20)
λ max $_{III}$ = 280 mμ ($\log\varepsilon_{mol}$ = 3,74)

Die korrespondierenden Aglyka der beiden Substanzen zeigten die gleichen Maxima.

Antibakterielle Prüfung des Arctiins.

Zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität benutzten wir das Loch-Testverfahren, eine Diffusionsmethode, die gegenüber dem Blättchen-Inhibitionstest den Vorteil größerer Genauigkeit bietet.

In der Mitte einer Nähragarplatte wurde mit einem Korkbohrer ein Loch (Durchmesser etwa 10 mm) ausgestanzt, und die Platte dann mit 3 Tropfen einer 24stündigen, flüssigen Kultur des Testbakteriums Staphylococcus aureus beimpft. Anschließend pipettierten wir o,1 ml der wäßrigen Arctiinlösung (steigende Konzentrationen: o,1 mg / 1 ml bis 1,o mg / 1 ml) in das Loch und bebrüteten den Nährboden 24 Stunden bei 37° C.

Isolierung eines Phytosterolins aus den Früchten von Cnicus benedictus L.

Bei der Extraktion der Kardobenediktenfrüchte mit Äther (Fraktion F_2) scheidet sich im Kolben eine grau-weiße Substanz ab; beim Einengen dieser Ätherfraktion fallen weitere Mengen dieser Substanz aus. Sie wurde abfiltriert, einige Minuten auf dem Wasserbad mit Methanol erhitzt und wiederum durch ein Papierfilter filtriert. Beim Konzentrieren der methanolischen Lösung fiel das Phytosterolin in Form von weißen Kristallnadeln aus, die je zweimal aus Amylalkohol und aus einer Mischung von Pyridin und Äthanol (1 + 2, v/v) umkristallisiert wurden.

Ausbeute aus 1 kg Früchte: 185 mg Sterolin. (= 0,0185 %).

Darstellung des Sterolinacetats.

20 mg des Sterolins wurden unter Erwärmen in 3 ml frisch destilliertem Pyridin gelöst und nach Versetzen mit 3 ml Essigsäureanhydrid 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurde das Reaktionsprodukt mit 50 ml Wasser in kleinen Anteilen versetzt und zur quantitativen Ausfällung des Niederschlags eine Stunde im Kühlschrank aufbewahrt. Das Sterolinacetat wurde auf einer Filternutsche gesammelt, zur restlosen Entfernung des Pyridins mit Wasser gewaschen und wiederholt aus absolutem Äthanol umkristallisiert.
Die Ausbeute betrug 14,8 mg Sterolinacetat.
Schmelzpunkt 162 - 163° C.

Farbreaktionen des Sterolins.

a) Nach Liebermann-Burchardt

Etwa 1 mg Sterolin wurden unter Erwärmen in 1 ml Acetanhydrid suspendiert und nach dem Erkalten mit einer Lösung von 2 Tropfen konz. Schwefelsäure in 0,5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Es trat sofort eine rotviolette Färbung ein, die sich in schneller Folge über Karminrot und dann über Blau nach Grün veränderte.

b) Nach Whitby.

Etwa 1 mg Sterolin wurde unter Erwärmen in konz. Schwefelsäure gelöst, die Lösung in einer Eis-Wasser-Mischung gekühlt und anschließend mit einer gesättigten wäßrigen Lösung von Thymol sorgfältig unterschichtet. Die untere Schicht färbte sich orange; in der Zwischenphase entstand eine violette Färbung, die sich nach einigen Minuten auf die obere Schicht ausdehnte.

Hydrolyse des Sterolins:

100 mg Sterolin wurden eine Stunde am Rückflußkühler mit 40 ml 0,2-n-äthanolischer Salzsäure hydrolisiert. Danach wurde die Hauptmenge des Äthanols unter vermindertem Druck abdestilliert und dem Rückstand 10 ml Wasser hinzugefügt. Das nun quantitativ ausgefallene Sterolinaglykon wurde abgesaugt und nach Waschen mit Wasser dreimal aus absolutem Äthanol umkristallisiert.
Ausbeute: 58 mg Sterolinaglykon.
Schmelzpunkt 134° C.

Reinigung des Sterolinaglykons.

58 mg Sterolinaglykon wurden in Benzol gelöst und an einer Säule von Aluminiumoxyd (Merck stand.nach Brockmann) (Höhe 15 cm,Durchmesser 1,5 cm), die vorher mit Benzol durchfeuchtet worden war, chromatographiert. Die Eluierung der Säule mit Benzol wurde vor einer UV-Lampe verfolgt. An der oberen Zone des Aluminiumoxyds wurde ein bläulich fluoreszierender Stoff adsorbiert, während das Sterolinaglykon langsam die Säule durchwanderte. Nach mehrtägiger Elution hatte das Sterolinaglykon die Säule passiert; das Benzol wurde durch Destillation entfernt, der Rückstand zweimal aus absolutem Äthanol umkristallisiert.
Ausbeute: 49 mg reines Sterolinaglykon.
Schmelzpunkt: 137 - 138° C.

Farbreaktionen des Sterolinaglykons:

a) nach Liebermann-Burchardt:

Die Farbreaktion nach Liebermann-Burchardt verlief positiv.

b) nach Salkowski:

Etwa 1 mg Sterolinaglykon wurde in 2 ml Chloroform gelöst und mit dem gleichen Volumen konz.Schwefelsäure unterschichtet. Zum Vergleich wurde die Reaktion unter gleichen Bedingungen mit umkristallisiertem authentischem β-Sitosterin ausgeführt: die Ergebnisse sind in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12

	Färbung	
	obere Phase	untere Phase
Sterolinaglykon	rot	grünlich-gelb
β-Sitosterin	rot	farblos

Acetylierung des Sterolinaglykons:

22,8 mg des Sterolinaglykons wurden unter den üblichen Bedingungen acetyliert.

Das Aglykonacetat wurde einmal aus Chloroform und zweimal aus absolutem Äthanol umkristallisiert.
Ausbeute: 18,4 mg Aglukonacetat.
Schmelzpunkt: 122 - 123° C.
Als Vergleichspräparat wurde β-Sitosterin unter gleichen Bedingungen in das Acetat übergeführt.
Schmelzpunkt: 128 - 129° C.

Nachweis der Zuckerkomponente des Sterolins.

Die nach der Hydrolyse des Sterolins resultierende salzsaure Zuckerlösung wurde im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt und durch vorsichtige Zugabe von Silberkarbonat neutralisiert. Das entstandene Kohlendioxyd wurde durch schwaches Erwärmen, das ausgefallene, sich langsam bläulich verfärbende, Silberchlorid durch Zentrifugieren und Filtration entfernt.

Ein Teil der Lösung wurde zum papierchromatographischen Nachweis, der andere zur Osazonbildung verwendet.

a) Papierchromatographischer Nachweis der Zuckerkomponente .

Aufgetragen wurden im Wechsel der Hydrolysezucker des Sterolins, eine 0,1 %ige Lösung authentischer D-Glucose und eine Mischung beider Lösungen.

Papier: Schleicher & Schüll 2043 b M.

Systeme: 1) n-Butanol-Pyridin-Wasser (6 : 4 : 3; v/v/v).
2) n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5; v/v/v).

Die Entwicklung erfolgte aufsteigend.

Die Flecken wurden durch Besprühen mit Anilinphthalatlösung nach Partridge und Trocknen bei 105° C (10 Minuten) sichtbar gemacht. Die R_F-Werte sind in der Tabelle 13 zusammengestellt:

Tabelle 13

Lösungsmittelsystem	1	2
Zuckerkomponente des Sterolins	0,36	0,21
D-Glucose	0,36	0,21

b) Osazonbildung:

Die Darstellung des Sterolin-Zuckerosazons erfolgte nach den üblichen Verfahren. Der Schmelzpunkt des Zuckerosazons betrug nach zweimaligem Umkristallisieren aus verdünntem Äthanol (70 %ig) 207 - 208° C. Im Mischschmelzpunkt mit authentischem Glucoseosazon trat keine Depression ein.

Chromatographie des Sterolinaglykons.

Zur Identifizierung des Sterolinaglykons wurden folgende zwei Chromatographie-Verfahren herangezogen:

a) Dünnschichtchromatographie nach E. Stahl.

Zur Herstellung der etwa 250 µ dünnen Kieselgel-G-Schichten wurde die DESAGA-Grundausrüstung Nr. 600 (Heidelberg) verwendet. Als adsorbierende Trägermasse diente das besonders feine Kieselgel G Merck nach Stahl.

Zur Bereitung der Dünnschichtplatten wurden 30 g Kieselgel G im Mörser in kleinen Anteilen mit 40 ml destilliertem Wasser zu einer homogenen Suspension verrührt, die dann mit weiteren 20 ml Wasser vermischt wurde. Dann wurde die Masse mit Hilfe des DESAGA-Streichgeräts gleichmäßig auf die Glasplatten aufgetragen. Zwischen Anrühren der Trägermasse und Bestreichen der Platten dürfen nicht mehr als vier Minuten vergehen, da sonst die mit Wasser angeteigte Masse infolge ihres Gehaltes an Gips - sehr schnell mit Wasser abbindet. Die präparierten Glasplatten wurden anschließend 30 Minuten im Trockenschrank bei 105° C getrocknet und dann bis zur Benutzung im Exsiccator aufbewahrt.

Zur Bereitung der Fluoreszenzplatten wurden 20 mg Natriumfluorescein (Merck) in 1,2 ml 1/10 n-Kalilauge gelöst, die Lösung auf ein Volumen von 60 ml mit Wasser aufgefüllt, und das Kieselgel in der gleichen Weise angerührt.

Das Sterolinaglykon und das Vergleichszwecken dienende authentische β-Sitosterin wurden in Chloroform aufgenommen, und die Lösungen mit Hilfe einer Mikropipette auf den Startpunkten, 1,5 cm vom unteren Rand entfernt, angereichert. Die Platten wurden dann in das Entwicklungsgefäß gestellt, worin sie nur 5 mm in das Lösungsmittel eintauchen dürfen. Als Laufphase diente eine Mischung aus Cyclohexan/Essigester (80/50; v/v); die Entwicklung dauerte 60 Minuten.

Nach dem Verdunsten des Lösungsmittelgemisches wurden die Platten mit einer gesättigten Lösung von Antimontrichlorid in wasserfreiem Chloroform besprüht und anschließend 5 Minuten bei 90° C im Trockenschrank aufbewahrt.

b) Papierchromatographie des Sterolinacetats nach P.Tunmann.

Die Papierstreifen (Schleicher & Schüll 2043 bM) wurden einige Minuten mit einer Lösung aus Paraffinum liquidum in Benzin im Volumenverhältnis 1 : 10 imprägniert, der Überschuß zwischen einer Lage Filtrierpapier abgepreßt. Anschließend wurden die Papierstreifen zur Verdunstung des Benzins an der Luft getrocknet.

Das Aglykonacetat und das wieder als Vergleich mitlaufende authentische β-Sitosterinacetat (Schmelzpunkt 128 - 129° C)

wurden in wenig Äther gelöst, der Lösung das gleiche Volumen flüssiges Paraffin zugegeben und auf den Startpunkten aufgetragen.

Als Lösungsmittel diente mit flüssigem Paraffin gesättigtes Äthanol; die Laufzeit betrug etwa 40 Stunden bei aufsteigender Entwicklung.

Das Chromatogramm wurde nach dem Trocknen mit einer Lösung von 10 g Trichloressigsäure, 0,2 g Chloramin in 30 g Wasser besprüht und anschließend zur Farbentwicklung 5 Minuten im Trockenschrank auf 120° C erhitzt.

UV-Absorptionsspektren des Sterolinaglykons.

Für das UV-Spektrum wurde das Sterolinaglykon nach der Reinigung an einer Aluminiumoxydsäule verwendet.
4,3 mg des 36 Stunden bei 50° C im Vakuum unter Phosphorpentoxyd getrockneten Aglykons wurden in ein 5 ml Meßkölbchen eingewogen und in wasserfreiem Chloroform (p.a.Merck) gelöst; dann wurde bis zur Marke mit dem Lösungsmittel aufgefüllt. 0,2 ml (= 17,2 γ) wurden mit Hilfe einer Mikropipette in ein Reagenzglas abpipettiert, das Chloroform vorsichtig auf dem Wasserbad abgedampft und dem trockenen Rückstand 3,5 ml konz. Schwefelsäure (1,84 p.a.Merck) hinzugefügt. Zur Entwicklung des Chromogens wurde der Ansatz mit einer unter den gleichen Bedingungen hergestellten Vergleichslösung von β-Sitosterin 12 Stunden bei 40° C im Thermostaten aufbewahrt. Anschließend wurde in einem Spektralphotometer die Absorption des Chromogens in Abhängigkeit von der Wellenlänge in dem Bereich von 210 - 450 mμ im Abstand von 5 mμ gemessen.
Die Messwerte sind aus der Tabelle ersichtlich.

1) Sterolinaglykon:

λ max $_{I}$ = 310 - 312 mμ
λ max $_{II}$ = 420 - 421 mμ
Inflexionen bei : 220 - 225 mμ
313 - 315 mμ
365 - 370 mμ

2) β-Sitosterin:

λ max $_{I}$ = 309 - 312 mμ
λ max $_{II}$ = 421 mμ

Isolierung einer weiteren kristallinen Substanz aus der Ätherfraktion (F_2) der Kardobenediktenfrüchte.

Die Ätherfraktion wurde nach dem Abscheiden des Sterolins auf ein kleines Volumen eingeengt, und der Rest des organischen Lösungsmittels an der Luft abgedunstet. Dabei hinterblieben etwa 1,2 g eines gelblich gefärbten ölig-schmierigen Rückstandes von aromatisch-stechendem Geruch, in dem in polarisiertem Licht unter dem Mikroskop kleine Kriställchen aufleuchteten. Da eine Isolierung der kristallinen Substanz durch mehrmaliges Umlösen aus Äther und Chloroform infolge der geringen Menge nicht gelang, wurde eine adsorptionschromatographische Auftrennung der Ätherfraktion an Aluminiumoxyd durchgeführt.

Etwa 80 g neutrales Aluminiumoxyd Merck wurden in eine Glassäule von 2,5 cm Durchmesser, die am unteren verjüngten Ende zur Regulierung der Abtropfgeschwindigkeit mit einem Hahn versehen war, in kleinen Anteilen trocken eingefüllt, und durch Klopfen mit einem Glasstab eine möglichst gleichmäßige Schichtung des Adsorptionsmittels bewirkt. Die Säule wurde oben mit einer Lage Watte bedeckt und sodann mit 150 ml wasserfreiem Äther durchfeuchtet. Der Rückstand wurde in 25 ml Äther aufgenommen, die trübe Lösung auf die Säule aufgetragen und anschließend mit dem gleichen Lösungsmittel chromatographiert. Im UV-Licht war lediglich eine langgestreckte blau fluoreszierende Zone zu erkennen, während im oberen Teil der Säule eine schmutzig-graue Substanz fixiert blieb. Das gelbliche Eluat wurde in Anteilen von 50 ml fraktioniert aufgefangen und das Lösungsmittel abgedampft. Allein aus der dritten Fraktion konnte eine in verhältnismäßig groben, gelblich gefärbten Rhomben kristallisierende Substanz gewonnen werden. Sie wurde einmal aus Äther und zweimal aus Chloroform umkristallisiert; aus letzterem Lösungsmittel fiel die Substanz in Form kleiner farbloser Nädelchen aus, die nach dem Trocknen einen Schmelzpunkt von 118-119° C aufwiesen.
Die Ausbeute betrug etwa 1,5 mg.

Bei der papierchromatographischen Prüfung auf Einheitlichkeit im System n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5; v/v/v);

organische Phase) waren lediglich vor der Purin-Lampe unmittelbar unter der Lösungsmittelfront zwei dicht aneinander liegende dunkle Flecken zu erkennen.

Infolge seines stark lipophilen Charakters wurde die Substanz nach der bereits bekannten Methodik auf Dünnschichtplatten im System Cyclohexanol-Essigester (80 : 50; v/v) chromatographiert. Dabei konnte eine Auftrennung in drei Substanzen erzielt werden, die nach dem Besprühen mit einer gesättigten Lösung von Antimontrichlorid in wasserfreiem Chloroform folgende R_F-Werte zeigten:

Tabelle 14

	R_F-Wert	Fluoreszenz im UV-Licht
Substanz I	0,96	dunkel
Substanz II	0,24	grünlich
Substanz III	0,18	hellorange

Auf eine weitere Trennung der isolierten Substanz in die drei chromatographisch nachgewiesenen Bestandteile wurde aufgrund der geringen Ausbeute verzichtet.

Phytochemisch-systematische Untersuchungen.

Die Herstellung der Extrakte aus Früchten der Cynareae.

500 mg der zu untersuchenden Früchte wurden in einem Mörser zerkleinert und quantitativ in ein Reagenzglas gebracht, das mit einem durchbohrten Korken verschlossen wurde. Durch die Bohrung führte zur Kondensation des siedenden Lösungsmittels ein dünnes Glasrohr von etwa 50 cm Länge. Die einzelnen Reagenzgläser wurden mit Hilfe eines Metallständers in ein elektrisch heizbares Wasserbad gestellt, so daß je nach Charakter des Lösungsmittels eine Temperaturregelung möglich war.

Die Früchte wurden vorerst je zweimal mit 5 ml Petroläther entfettet und anschließend je zweimal mit 5 ml Methanol ausgezogen. Die Extraktionsdauer betrug jedesmal 15 Minuten. Nach dem Erkalten wurden die Extrakte zur Entfernung von Ballaststoffen durch Watte gegossen und anschließend zur weiteren Reinigung durch eine kleine Säule von neutralem Aluminiumoxyd Merck (1,5 cm Durchmesser, 3 cm Höhe) filtriert. Zur Eluierung der sich mit konz. Schwefelsäure rotviolett anfärbenden Substanzen wurde mit jeweils 5 ml Methanol nachgewaschen; am oberen Rand der Säule blieben braun und gelb gefärbte phenolische Substanzen fixiert. Die nunmehr farblosen oder nur noch schwach gelblichen Filtrate wurden auf ein Endvolumen von 5 ml eingeengt und zur Chromatographie verwendet.

Zur besseren Auftrennung der einzelnen Inhaltsstoffe wurde nach dem zweidimensionalen Verfahren gearbeitet.

Chromatographierpapier:

Verwendet wurde das Chromatographierpapier Nr. 2043 bM der Firma Schleicher & Schüll, das zu einem Format 24 x 24 cm geschnitten wurde.

Entwicklungsgemische:

Für die Entwicklung der Papierchromatogramme kamen folgende Lösungsmittel zur Anwendung:

1. Dimension: die obere organische Phase des dimeren Gemisches:
n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5; v/v/v)
die untere wässrige Phase diente zur Sättigung der Kammeratmosphäre.
2. Dimension: das einphasige Gemisch Eisessig-Wasser (15 : 85 v:v).

Entwicklung der Chromatogramme:

Als Chromatographiergefäß diente eine Kammer zur Rundfilterchromatographie. Auf den Startpunkt, der in der unteren linken Ecke je 4 cm vom Papierrand entfernt eingezeichnet war, wurden mittels einer graduierten Mikropipette je 0,05 ml des vorgereinigten Methanolextrakts aufgetragen, die Papiere mit Hilfe von Tesafilm zylinderförmig zusammengefaltet, so daß in einem Arbeitsgang mehrere Chromatogramme unter gleichen Bedingungen angefertigt werden konnten. Nach einer Sättigungsdauer von 6 Stunden wurden die Chromatogramme aufsteigend zur Vortrennung entwickelt, anschließend mit Hilfe eines Ventilators getrocknet und unter gleichen Bedingungen in der zweiten Dimension chromatographiert. Die Laufzeit betrug für das Partridge-Gemisch 5 Stunden, für das Eisessig-Wasser-Gemisch 3 Stunden.

Auswertung der Chromatogramme.

Nach dem Trocknen wurden die bei Tageslicht und im UV-Licht sichtbaren Flecken markiert. Die die Farbreaktion mit konz. Schwefelsäure gebende Substanz konnte nur vor der Purin-Lampe infolge Fluoreszenzlöschung als dunkler Fleck erkannt werden.

R_F - Wert (1. Lauf) = 0,62
R_F - Wert (2. Lauf) = 0,84

Anschließend wurden die Chromatogramme auf einer Glasplatte mit konz. Schwefelsäure behandelt.

Anfertigung von Vergleichschromatogrammen.

Nach der oben beschriebenen Methode wurden aus den Methanolextrakten nochmals Chromatogramme hergestellt, die vor der Purin-Lampe sichtbare dunkle Zone aus dem Papier ausgeschnit-

ten, und die Substanz in einem kleinen Erlenmeyer-Kolben (10 ml) sofort durch Erwärmen mit 5 ml Methanol eluiert. Nach dem Einengen der Lösung auf ein Volumen von etwa 0,1 ml wurde die eine Hälfte der Lösung abwechselnd mit einer Arctiinlösung im Abstand von je 3 cm auf einem neuen Chromatogramm aufgetragen. Das so angefertigte Chromatogramm wurde im Lösungsmittelgemisch n-Butanol-Eisessig-Wasser entwickelt. Die zweite Hälfte der Lösung wurde ebenfalls im Wechsel mit der Arctiinlösung auf einem zweiten Chromatogramm angereichert und mit dem Laufmittelgemisch Eisessig-Wasser chromatographiert. Zur Sichtbarmachung der Substanzen und zum Vergleich der R_F-Werte wurde ein Chromatogramm mit konz. Schwefelsäure behandelt, das zweite mit einer gesättigten Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform besprüht und anschließend 10 Minuten bei 90° C im Trockenschrank erhitzt.

Elution der Flecke zwecks Aufnahme eines qualitativen UV-Absorptionsspektrums.

Es wurden nach der oben beschriebenen Methode neue zweidimensionale Chromatogramme angefertigt, die dunklen Flecken wiederum mit Methanol (p. a. Merck) eluiert, die Lösungen eingeengt und anschließend im Spektralphotometer die UV-Absorption in dem Bereich von 210 - 290 mμ in einem Abstand von 5 mμ gemessen.

Isolierung eines Flavonol-3-glykosids aus den Blättern von Arctium tomentosum L.

Das Pflanzenmaterial, das im Juli 1959 im Botanischen Garten in Berlin-Dahlem gesammelt worden war, wurde einige Stunden im Trockenschrank bei 60° C getrocknet, anschließend in einem Mörser zerkleinert und von groben Stengelteilen befreit.

Etwa 50 g Blätter wurden in einem Soxhletapparat mit Petroläther zur Entfernung lipoidlöslicher Substanzen extrahiert, bis das Lösungsmittel farblos ablief. Diese Petrolätherfraktion wurde verworfen.

Anschließend wurden die Blätter 24 Stunden mit 500 ml Methanol ausgezogen, der durch das Chlorophyll dunkelgrün gefärbte Extrakt durch ein Papierfilter filtriert, und nach Zugabe von 5 g Calciumcarbonat, zur Neutralisation der Pflanzensäuren, das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Es resultierte ein grünbrauner Rückstand von sirupartiger Konsistenz, der zur Entfernung des Chlorophylls dreimal mit je 100 ml heißem Wasser digeriert wurde. Die noch heiße wäßrige Phase wurde durch eine Watteschicht filtriert, im Vakuum auf ein Volumen von 100 ml konzentriert und 12 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Dabei hatten sich weitere Verunreinigungen am Gefäßboden abgeschieden, die durch Zentrifugieren und Filtration entfernt wurden. Zur restlosen Beseitigung des Chlorophylls und anderer Ballaststoffe wurde die wäßrige Lösung je dreimal mit Äther und Chloroform ausgeschüttelt. In beiden Fraktionen konnten papierchromatographisch keine flavonoiden Verbindungen erkannt werden; sie wurden daraufhin verworfen. Der auf diese Weise gereinigte bräunlich-gelbe, wäßrige Extrakt wurde nun 10mal mit einem Liter Äthylacetat in kleinen Anteilen ausgeschüttelt, bis die organische Phase nicht mehr gelb gefärbt war. Die vereinigten Essigesterfraktionen wurden nach dem Trocknen über geglühtem Natriumsulfat durch Destillation im schwachen Vakuum vom Lösungsmittel befreit; es hinterblieb ein schmierig-bräunlicher Rückstand, der von gelben körnigen Kristallaggregaten durchsetzt war. Nach Aufnehmen des Rückstandes in 70 %igem Äthanol bzw. anschließend in einem Aceton-Wasser-

Gemisch (3 : 1) konnte trotz mehrtägigen Stehens keine Kristallisation der flavonoiden Substanz erreicht werden. Aus diesem Grunde wurde eine weitere Auftrennung der Essigesterfraktion durch Chromatographie an einer Magnesol-Säule durchgeführt.

Säulenchromatographie an Magnesol.

In eine Glassäule von 15 cm Länge und 1,5 cm Durchmesser, die am unteren verjüngten Ende mit einer Lage Watte verstopft war, wurden etwa 50 g Magnesol gegeben, durch vorsichtiges Klopfen mit einem Glasstab gleichmäßig verteilt, und die obere Schicht mit einer 2 cm hohen Seesandzone beschwert, um beim Eluieren ein Aufrühren des Adsorptionsmittels zu vermeiden.

Der Rückstand der Essigesterfraktion wurde in 10 ml wasserfreiem Aceton gelöst und mit Hilfe eines kleinen Scheidetrichters auf die Säule aufgetropft. Anschließend wurde unter schwachem Sog mit wassergesättigtem Essigester eluiert.
Abtropfgeschwindigkeit 0,5 ml pro Minute.
Es erfolgte eine Auftrennung in 5 Zonen, die von oben nach unten beschrieben im Tages- und UV-Licht folgende Färbungen zeigten:

T a b e l l e 15

	Tageslicht	UV-Licht
1. Zone : 3 cm	bräunlich-orange	bräunlich-grau
2. Zone : 0,5 cm	gelblich	dunkelgelb
3. Zone : 1 cm	schwachgelblich	hellblau
4. Zone : 3 cm	gelb	braungelb
5. Zone : 3 cm	schwach hellgrün	hellgrün

Die einzelnen Zonen wurden fraktioniert aufgefangen und papierchromatographisch geprüft:
System : n-Butanol-Eisessig-Wasser; 4 : 1 : 5; v/v/v.
Die flavonoide Substanz war in der 4. Zone angereichert. Die jeweilige Übergangsfraktion zu den Zonen 3 bzw. 5 wurde verworfen; die mittlere Fraktion der Zone 4 enthielt das Flavonoid in reiner Form.

Nach Abdunsten des Acetons wurde der gelbkörnige Rückstand heiß in wenig Äthanol gelöst, und das gleiche Volumen Wasser hinzugefügt. Nach mehrtägiger Unterkühlung kristallisierte das Glykosid in Form von kleinen gelblichen Nadeln aus, die im polarisiertem Licht stark aufleuchteten.
Ausbeute : 2,5 mg Glykosid. (= 0,005 %).
Der Schmelzpunkt betrug nach 12stündigem Trocknen im Vakuum über Phosphorpentoxyd 225 - 227° C.

Isolierung eines Flavonol-3-glykosids aus Herba Bardanae.

Die Isolierung des flavonoiden Glykosids aus Herba Bardanae erfolgte nach der gleichen Methode.
1 kg Herba Bardanae (Handelsware der Firma Mix) wurde in mehreren Anteilen mit Petroläther ausgezogen und anschließend mit 5 l Methanol erschöpfend extrahiert, der Extrakt eingeengt,und der Rückstand mit insgesamt 500 ml Wasser aufgenommen. Nach Abscheidung der begleitenden Ballaststoffe und Einengen der wäßrigen Phase wurde 20mal mit je 100 ml Äthylacetat ausgeschüttelt, und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen.
Ausbeute : 25 mg Rohkristallisat.
Die weitere Fraktionierung wurde diesmal an einer Polyamid-Säule vorgenommen.

Chromatographie an einer Polyamid-Säule.

Die Herstellung und Präparierung der Perlon-Säule erfolgte nach der bei der Isolierung der Cnicussubstanz C beschriebenen Methode.

Das mit Wasser angeschlämmte Perlonpulver wurde in eine Glassäule von 35 cm Länge und 3 cm Durchmesser geschichtet und gründlich mit Wasser gewaschen.

Der Rückstand der Essigesterfraktion wurde in 50 %igem Methanol aufgenommen, und die Lösung mit Hilfe eines Scheidetrichters auf die Säule aufgetropft. Anschließend wurde mit etwa 500 ml Wasser eluiert, bis sich die einzelnen Zonen gut getrennt hatten. Später wurden zur schnelleren Elutierung der flavonoiden Substanz 20 %iges Methanol (500 ml) und 50 %iges Methanol (1 l) benutzt; Abtropfgeschwindigkeit 1 ml pro Minute. Die Säulenchromatographie wurde unter UV-Licht verfolgt. Die dunkelbraune, getrennt aufgefangene Flavonoidzone wurde sofort papierchromatographisch geprüft.

System : n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5; v/v/v)
Auf dem Chromatogramm zeigte sich neben dem Flavonolglykosid (R_F = 0,42-0,44) eine hartnäckige Begleitsubstanz, die im UV-Licht kräftig blau fluoreszierte. Die Flavonoidzone wurde aus diesem Grunde einer erneuten fraktionierten Trennung an einer Polyamid-Säule unterworfen.

Diesmal wurde nur mit Wasser eluiert; bei nur geringer Wanderungsgeschwindigkeit hatte das Flavonol-3-glykosid nach etwa 36 Stunden die Säule passiert. Ein sofort angefertigtes Kontrollchromatogramm zeigte nach dem zweiten Säulendurchgang keinerlei Verunreinigungen.

Die Flavonoidfraktion wurde im Vakuum eingeengt, und die Reinsubstanz mehrmals aus verdünntem Äthanol und heißem Wasser umkristallisiert.

Identifizierung des Flavonol-3-glykosids.

Der Schmelzpunkt der feinen gelben Nadeln betrug nach Konstanttrocknung in einer Vakuumpistole 226 - 227° C. Ein Mischschmelzpunkt mit der aus den Blättern von Arctium tomentosum L. isolierten flavonoiden Verbindung zeigte keine Depression.

Quantitative Hydrolyse.

8,9 mg des Flavonolglykosids wurden mit 5 ml 0,2 n-Schwefelsäure eine Stunde lang auf einem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach 15 Minuten bereits begann sich ein kristalliner, intensiv gelbgefärbter Niederschlag zu bilden, der mit der Zeit an Konzentration zunahm. Das Hydrolyseprodukt wurde eine Stunde im Kühlschrank aufbewahrt; danach wurde das Aglykon mit Hilfe einer kleinen Mikronutsche abgesaugt, mit kaltem Wasser säurefrei gewaschen und nach Konstanttrocknung bei 120° C gewogen:
Ausbeute: 5,58 mg (= 62,7 %).

Das Aglykon wurde zweimal aus verdünntem Methanol umkristallisiert und schmolz nach Trocknen bei 120° C unter Braunfärbung in einem Schmelzpunktintervall von 298 - 302° C. Ein Mischschmelzpunkt mit authentischem Quercetin zeigte keine Depression.

Acetylierung des Aglykons.

Etwa 4 mg des bei 120° C getrockneten Aglykons wurden in einem 10 ml Acetylierungskölbchen mit 3 ml Essigsäureanhydrid und 0,5 ml reinem Pyridin unter Hinzufügen von ca. 0,2 g frisch geschmolzenem Natriumacetat eine Stunde lang erhitzt. Das Reaktionsprodukt wurde durch Zusatz von etwa 10 ml Wasser ausgefällt und nach einstündiger Unterkühlung bei -2° C auf einer Mikronutsche abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und zweimal aus heißem Methanol umkristallisiert.

Das Pentaacetylquercetin kristallisierte in feinen, farblosen Nadeln und schmolz bei 188 - 190° C.

Im Mischschmelzpunkt mit authentischem Pentaacetylquercetin trat keine Depression ein.

Bestimmung der Zuckerkomponente des Flavonolglykosids.

Die nach der Hydrolyse verbleibende schwefelsaure Zuckerlösung wurde durch vorsichtige Zugabe von Bariumkarbonat neutralisiert, und das entstandene Bariumsulfat durch Zentrifugieren und Filtration entfernt. Anschließend wurde die Zuckerlösung im Vakuum auf etwa 1 ml eingeengt und ein Teil zur papierchromatographischen Prüfung, der andere zur Osazonbildung verwendet.

a) Papierchromatographischer Nachweis.

Als Ergebnis der bisherigen Untersuchungen konnte das Flavonolaglykon nur mit Glucose oder evt. noch mit Galactose am Kohlenstoffatom 3 verglykosidiert sein. Aus diesem Grunde wurden beide Zucker als authentische Vergleichssubstanzen in 0,1 %igen Lösungen herangezogen. Auf die Startlinie wurden demnach folgende Lösungen bzw. Mischlösungen in Reihenfolge aufgetragen:
1. Glucose, 2. Hydrolysezucker, 3. Galactose, 4. Hydrolysezucker und Glucose, 5. Hydrolysezucker und Galactose und 6. Glucose und Galactose.

Papier : Schleicher & Schüll 2043 b M.
Lösungsmittelsystem : 1. α-Picolin-Ammoniak-Wasser (70 : 2 : 28)
2. n-Butanol-Pyridin-Wasser (6 : 4 : 3)

Die Fixierung der Chromatogramme erfolgte durch Besprühen mit Anilinphthalatlösung (nach Partridge) und Trocknen bei 105° C (10 Minuten).

Tabelle 16

R_F - Werte der Zucker

	Lösungsmittelsystem	
	1	2
Glucose	0,72	0,36
Hydrolysezucker	0,72	0,36
Galactose	0,69	0,34

In beiden Systemen war eine sichtbare Trennung von mitlaufender Galactose erkennbar.

b) Osazonbildung.

Zum weiteren Identitätsbeweis wurde der andere Teil des Hydrolysezuckers mit dem gleichen Volumen einer Lösung von 2 g Phenylhydrazinhydrochlorid und 3 g Natriumacetat (wasserfrei) in 20 ml Wasser eine Stunde zur Osazonbildung auf dem Wasserbad unter Rückflußkühlung erhitzt. Das Osazon schied sich beim Erkalten als gelber Niederschlag ab und wurde sofort auf einer Mikronutsche mit etwas Wasser gewaschen und anschließend bis zur Schmelzpunktkonstanz aus 70 %igem Äthanol umkristallisiert. Nach dem Trocknen schmolzen die dünnen gelben Nädelchen bei 207 - 208° C.

Im Mischschmelzpunkt mit analog hergestelltem Glucoseosazon trat keine Depression ein.

Papierchromatographie des Glykosids und Aglykons.

Das isolierte Flavonol-3-glykosid und das durch Hydrolyse gewonnene Aglykon Quercetin wurden im Wechsel und in gleichkonzentrierten Mischlösungen mit authentischen Substanzen auf den Startpunkten angereichert und mit folgenden Entwicklungsgemischen auf Papier Schleicher & Schüll 2043 b M chromatographiert:

1. n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5 v/v/v; aufsteigd.)
2. Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2 : 5 : 5 v/v/v; aufsteigd.)
3. Essigester-Ameisensäure-Wasser (10 : 2 : 3;v/v/v; absteigd.)
4. Eisessig-Wasser (15 : 85; v/v ; aufsteigd.)
5. Eisessig-Wasser (60 : 40; v/v ; aufsteigd.)

Bei den dimeren Gemischen wurde die organische Phase zur Entwicklung, die wäßrige Phase zur Sättigung der Kammeratmosphäre verwendet.

Tabelle 17

R_F - Werte und Farbreaktionen der flavonoiden Substanzen

Flavonoide	Systeme					Färbung			
	1	2	3	4	5	$AlCl_3$ 1% (CH_3OH)		Bas.Bleiacetat	
						TL	UV	TL	UV
Flavonol-3-glk.	0,45	0,69	0,56	0,43	-	G	G	G	O
Auth.Hyperosid	0,44	0,68	0,55	0,43	-	G	G	G	O
Flavonolaglk.	0,68	-	0,80	-	0,32	G	G	B	O
Quercetin	0,68	-	0,80	-	0,32	G	G	B	O

Zeichenerklärung: G = gelb
O = orange
B = braun

Zirkon-Zitronensäure-Test nach L.Hörhammer u.R.Hänsel, modifiziert von L.Hörhammer u.K.H.Müller.

Je ein Chromatogrammstreifen des Flavonolglykosids und des Aglykons wurden mit einer 2 %igen Lösung von Zirkonoxychlorid (Merck) in Methanol besprüht, die gelben Flecken nach dem Trocknen markiert und anschließend mit einer 5 %igen wäßrigen Lösung von Zitronensäure behandelt. Während der Fleck des Aglykons sich in der Farbtönung nicht veränderte, trat bei der Glykosidzone eine Fluoreszenzlöschung ein, die eine Veresterung oder Verätherung der Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 3 anzeigt. Sie wurde herausgeschnitten und etwa 2 Minuten lang den Nebeln einer 25 %igen

Chlorwasserstofflösung ausgesetzt: die Gelbfärbung der markierten Zone trat wieder auf.

Tauböck-Test.

Aus einem Chromatogramm wurde die Flavonolzone ausgeschnitten, mit Methanol eluiert, und die Lösung in einer Abdampfschale mit etwa aliquoten Teilen Borsäure und Oxalsäure zur Trockne eingedampft. Der gelbe Rückstand wurde in Äther aufgenommen: die Lösung zeigte die für 3-Oxyflavone typische grüne Fluoreszenz am Tageslicht.

Quantitatives UV-Absorptionsspektrum des Flavonol-3-glykosids und des Aglykons.

Die kristallwasserfreien Substanzen wurden in Methanol (p.a.Merck) gelöst, und mit einem Spektralphotometer die Absorption der Substanzen in Abhängigkeit von der Wellenlänge in einem Abstand von 5 mμ gemessen. Die UV-Absorptionskurven der isolierten Substanzen stimmten nach Lage und Höhe der Banden mit den Literaturwerten dieser Verbindungen überein.

Glykosid:

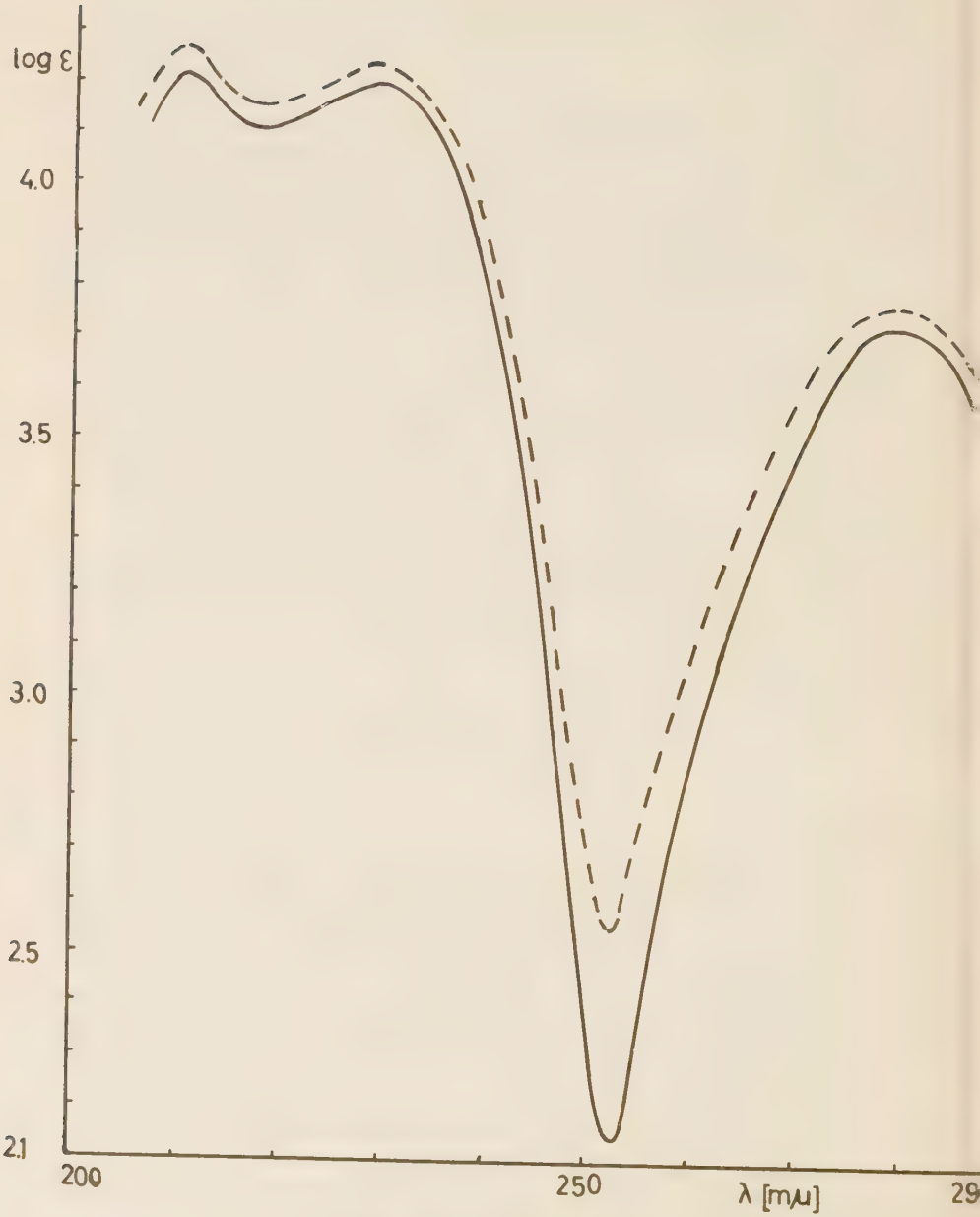
$\lambda_{max\ I} = 257\ m\mu\ (\log \varepsilon_{mol} = 4{,}84)$

$\lambda_{max\ II} = 358\ m\mu\ (\log \varepsilon_{mol} = 4{,}78)$

Aglykon:

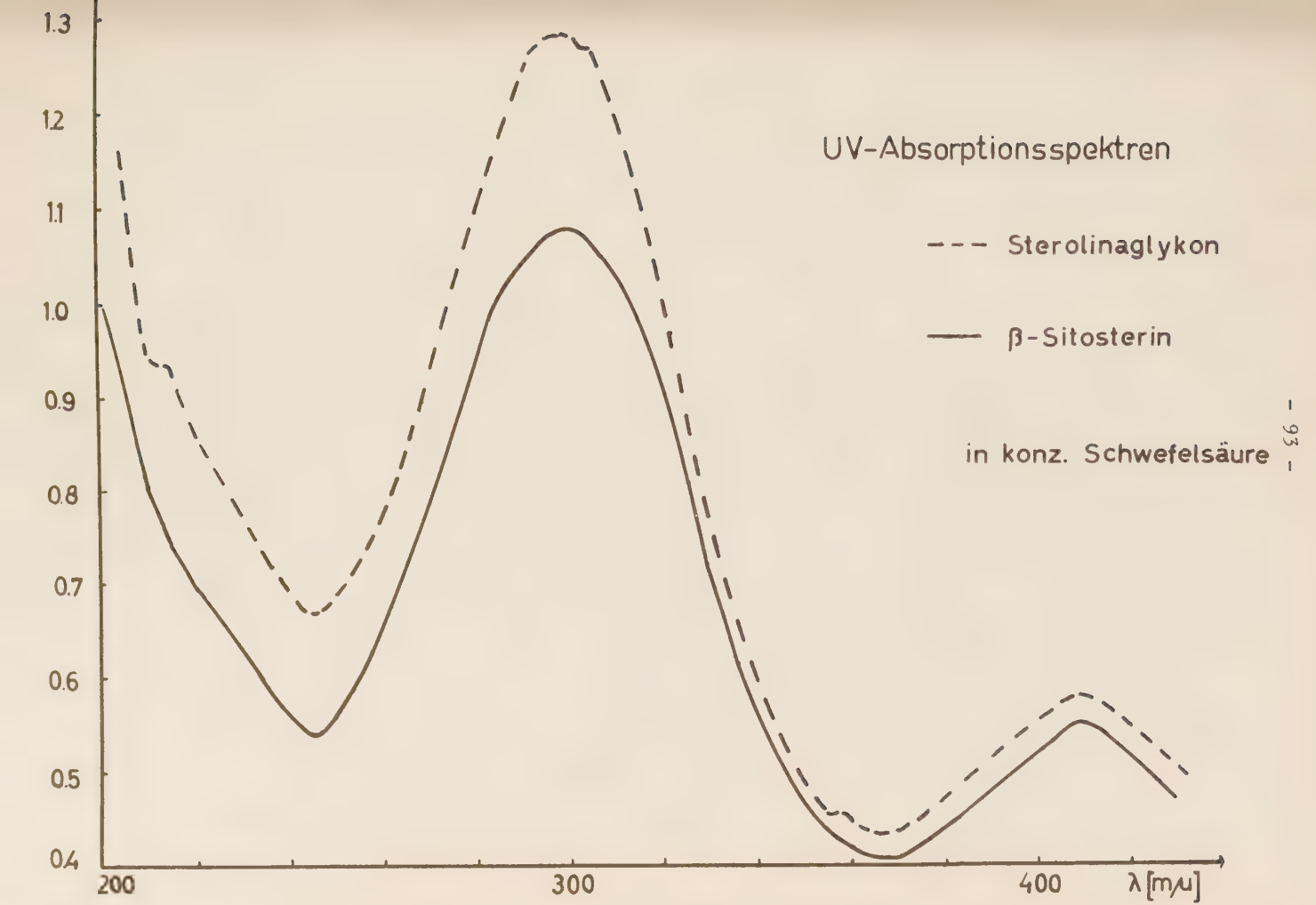
$\lambda_{max\ I} = 255\ m\mu\ (\log \varepsilon_{mol} = 5{,}19)$

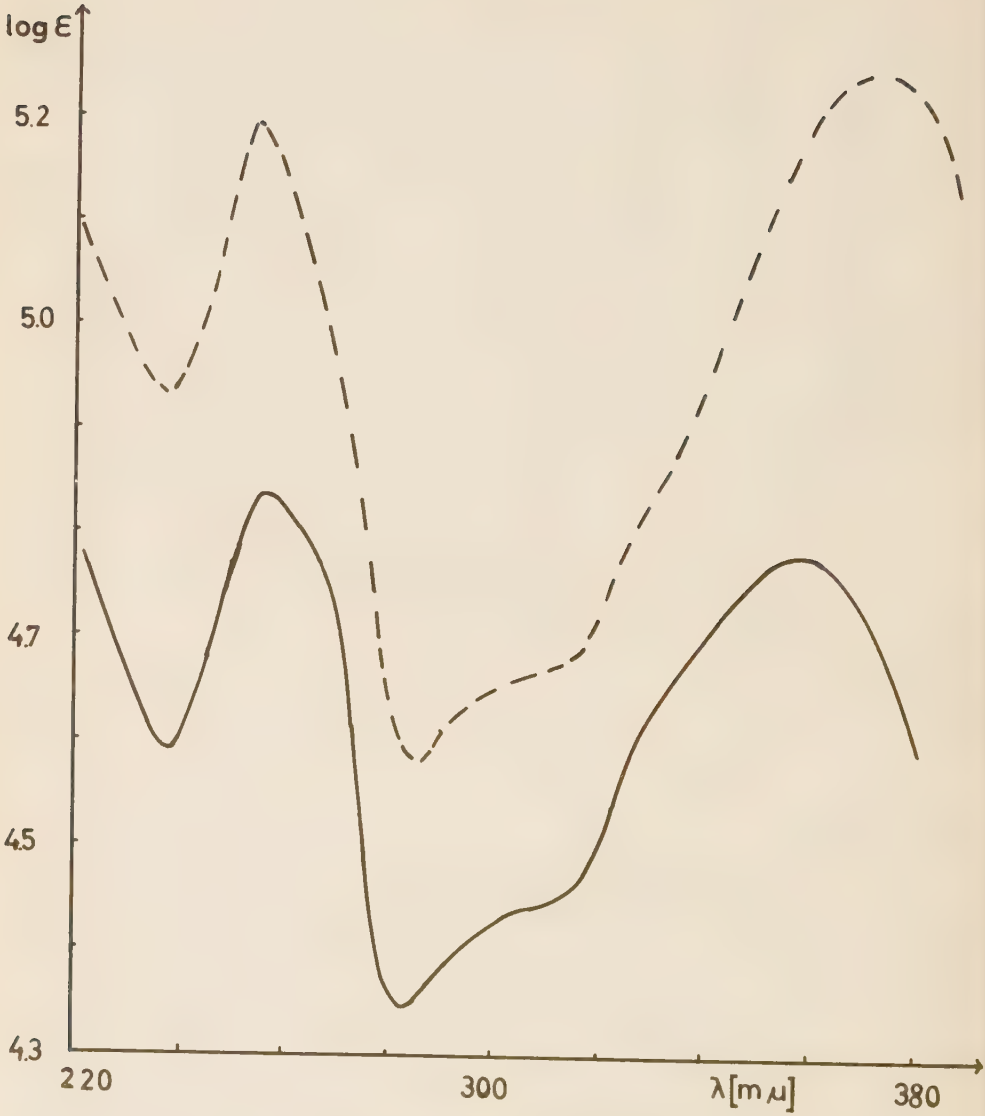
$\lambda_{max\ II} = 371\ m\mu\ (\log \varepsilon_{mol} = 5{,}24)$



UV-Absorptionsspektren

—— Cnicussubstanz C - - - Arctiin


UV-Absorptionsspektren
--- Sterolinaglykon
—— β-Sitosterin
in konz. Schwefelsäure
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
200
300
400
λ [mμ]



UV-Absorptionsspektren

—— Flavonol-3-glucosid – – – Aglykon

aus Arctium tomentosum

Literaturverzeichnis

Anderson, R.J. u. F.P.Nabenhauer	J.Amer.Chem.Soc.46,1957 (1924); 48,2972 (1926)
Anderson,R.J. u. R.L.Shriner	J.Amer.Chem.Soc.48,2976 (1926); J.Biol.Chem.71,401 (1927)
Aronoff,S.	J.org.Chem. 5,561 (1940)
Bate-Smith,E.C.u. R.G.Westall	Biochim.biophys.Acta 4,427 (1950)
Batzer, H.	Chemiker-Ztg. 76,397 (1952)
Berger,F.	"Handbuch der Drogenkunde",Bd.III (1952)
Bernstein,S.u. R.H.Lenhard	J.org.Chem.18, 1146 (1952)
Böhme,H.u.Th.Severin	Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 290/62,285 (1957);290/62,405-412 (1957)
Brieskorn,C.H.u. L.Capuano	Ber.dtsch.chem.Ges. 86, 866 (1953)
Brieskorn,C.H.u. H.Herrig	Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 292/64, 485 (1969)
Briggs,L.H.u.R.Locker	J.Chem.Soc.1949,2137;1951,3136
Brockmann,H.	Hoppe-Seylers Z. 241, 104 (1936)
Burchardt,H.	Diss.Rostock 1889;Chem.Zbl.1890 I,25
Carelli,V.,A.M. Liquori, A.Mele	Nature 176, 70 (1955)
Cartwright,R.A.u.Mitarb.	Chem.and Ind.1062 (1955)
Cavallito,C.J.,J.H.Bai- ley u.F.K.Kirchner	J.Amer.Chem.Soc. 67, 948-50 (1945)
Chabrol,E.u.Mitarb.	C.r.Soc.Biol.108, 1100 (1931)
Cronquist,A.	Amer.Midl.Nat.53;478 (1955);ref.Bot. Jb. 77 (4) 19-20 (1958)
Diaz,G.u.Mitarb.	J.org.Chem. 17, 747 (1952)
Everest,A.E.	Proc. Roy, Soc. (London),Ser.B. 87,44 (1914)
Freudenberg,K.	Fortsch.d.Chem.org.Naturst.,Bd.11 43, Wien, Springer-Verlag (1954)
Geissmann,T.A.u. E.Hinreiner	Bot. Rev. 18, 77 (1952)
Geissmann, T.A.	in K.Paech u.M.V.Tracey "Mod.Method. d.Pflanzenanalys."Bd.III,Springer-Verlag (1955)

Geßner, O.	"Die Gift- u.Arzneipflanzen v.Mitteleuropa",Heidelberg (1953),S.462
Grassmann,W.,H.Hoermann u.A.Hartl	Makromolekular. Chem.21,37 (1956)
Hager	"Handbuch d.Pharm.Praxis",Bd.I,Springer-Verlag (1949)
Hänsel,R.	in Linskens,H.F.:"Papierchromatographie i.d.Botanik",Springer-Verl.(1959)
Hänsel,R.,Pinkewitz G.,Langhammer,L.,Heise,D.	Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 293/65, 485 (1960)
Haworth,R.D.u.W.Kelly	J.Chem.Soc. 1936, 998-1003
Hegi, G.	"Flora v.Mitteleuropa",Bd.VI,2 (1929)
Hegnauer,R.	Pharmac.Acta Helvet.33, 287-305 (1958)
Hoffmann,O.	i.Engler-Prantl,"Die natürl.Pflanzenfamil.",Teil IV,Leipzig (1897)
Hoppe,H.A.	"Drogenkunde" 7.Aufl.,Hamburg (1958)
Hörhammer,L., H.Wagner,W.Leeb	Naturwissenschaften 44,513 (1957)
Hörhammer,L.u.R.Hänsel	Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 287/59, 117-128 (1954)
Hörhammer,L.u.R.Hänsel	Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 286/58, 447-452 (1953)
Hörhammer,L.u. K.H.Müller	Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 287/59, 310-313 (1954)
Hörhammer,L.R.Hänsel u.F.Strasser	Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 285/57, 286-290 (1952)
Ice,C.H.u.S.H.Wender	Analyt.Chem. 24, 1616 (1952)
Janiak, B.	Dissertation Berlin 1960
Kaufmann,H.P.u. W.H.Nitsch	Fette,Seifen,Anstrichmittel 56, 154 (1954)
Kirmayer,W.J.	Dissertation München 1959
Korte,F.	Naturwissenschaften 16, 390 (1958)
Kostytschew,S.	"Lehrbuch der Pflanzenphysiologie" Berlin 1926
Leonhardt,R.	Oesterr.Bot.Ztschr.96,3/4,293 (1949)
Liebermann,C.	Ber.dtsch.chem.Ges. 18,1803 (1885)
Lindner,M.W.	Pharmazeut.Zentralhalle 1948, 65
Lindner, M.W.	Arzneipflanz.-Umsch.Bd.II,36.Folg.
Lindstedt,G.	Acta chem.Scand. 4, 447 (1950)

Mockle,J.A.u.Sr. Patrick	Acta Phytotherapeut.Vol.VII,Nr.6 (1960)
Neu,R.	Nature 182, 660 (1958)
Omaki,T.	J.Pharm.Soc.Japan 55,(1935);Chem.Abstracts 33, 582 (1939)
Omaki,T.	J.Pharm.Soc.Japan 56,(1936);Chem.Abstracts 33, 583 (1939)
Omaki,T.	J.Pharm.Soc.Japan 57,(1937);Chem.Abstracts 33, 1716 (1939)
Omaki,T.	J.Pharm.Soc.Japan 57,(1937);Chem.Abstracts 31,5347 (1937)
Osborn,E.M.u.Mitarb.	Nature 158, 744 (1946)
Oshima,Y.u.Mitarb.	J.agr.chem.Soc.Japan 25,487 (1952)
Paech,K.	"Biochem.u.Physiol.d.Sekund.Pflanzenstoffe" Bd.I,Springer-Verlag (1950)
Partridge,S.M.	Nature 164, 493 (1949)
Patrick, Sr.	Contribution à l'étude botanique, chimique et pharmacodynamique de la Bardane, Thèsede Maitrise, Montréal (1958)
Pearl,J.A.u.E.Dickey	J.Amer.chem.Soc. 73,863-864 (1951); J.Amer.chem.Soc. 74,614 (1952)
Pew,J.C.	J.Amer.chem.Soc. 70,3031-3034 (1948)
Pilarczyk,W.	Planta Medica 6.Jahrg.,S.258 (1958)
Plourde,R.u.J.A.Mockle	Can.Pharm.J.,Scient.sect.sous presse
Power,F.B.u.F.Tutin	Am.J.Pharm.,80,251 (1908)
Power,F.B.u.A.H.Salway	J.Chem.Soc. 399 (1913)
Reznik,H.	S.B.Heidelb.Akad.Wiss.,math.naturw. Kl.1956 Nr.2
Salkowski,E.	Hoppe-Seylers Z. 57, 523 (1908)
Shinoda,J.u. M.Kawagoye	J.Pharm.Soc.Japan 49,565-75 (1929); Chem.Abstracts 23,4707 (1929)
Shinoda,J.	J. Pharm.Soc.Japan 48, 35 (1928)
Stahl,E.	Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958)
Stoll,A.u.E.Jucker	in Paech-Tracey:"Mod.Method.der Pflanzenanalyse" Bd.III,Springer-Verlag (1955)
Tauböck,K.	Naturwissenschaften 30,439 (1942)
Thornton,M.H.,H.R.Kraybill u.F.K.Broome	J.Amer.Chem.Soc.,63,2079 (1941)

Tunmann, P.	Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 289/61, 704-714 (1956)
Wehmer,C.	"Die Pflanzenstoffe",Jena 1929; Erg.-Bd.1935
Whitby,G.S.	Biochem.J., 17, 5 (1923)
Williams,A.H.	Chem.and Ind. 120 (1955)
Wilson, C.W.	J.Amer.Chem.Soc.61,2303 (1939)
Willstätter,R. u.H.Mallison	S.B.preuß.Akad.Wiss.phys.math. Kl.769 (1914)
Winteringham, F. u. Mitarb.	Nature (London) 166, 999 (1950)
Winterstein, A. u. G. Stein	Hoppe-Seylers Z. 220, 247 (1933)

Lebenslauf

Ich wurde am 18.März 1930 als Sohn des Prokuristen Willi Schulz und seiner Ehefrau Martha, geb. Schmidt, in Berlin geboren.

Nach vierjährigem Besuch der 8. Volksschule wurde ich zu Ostern 1940 in die Mittelschule Berlin-Weißensee umgeschult, von der ich im Juni 1942 auf das Realgymnasium Berlin-Weißensee überwechselte. Am 1.Juli 1948 legte ich an der inzwischen in Oberschule Berlin-Weißensee umbenannten Lehranstalt das Abitur ab.

Am 1.April 1949 trat ich als Praktikant in die Adler-Apotheke Berlin-Tegel ein. Nach bestandenem pharmazeutischen Vorexamen im März 1951 war ich dort bis zu Beginn meines Studiums im November 1953 als Assistent tätig.

Die ersten beiden Semester studierte ich an der Technischen Universität in Berlin-Charlottenburg, später an der Freien Universität in Berlin-Dahlem, wo ich im Herbst 1956 das pharmazeutische Staatsexamen ablegte. Nach einer Kandidatenzeit in der Adler-Apotheke Berlin-Tegel erhielt ich im Dezember 1957 die Bestallung als Apotheker.

Seit Januar 1958 beschäftige ich mich mit der vorliegenden Arbeit unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. Hänsel, Direktor des Instituts für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin.

Fotodruck Arno Brynda, Berlin W 35